



ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA BLUETONGUE DE SEROTYPE 8
PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Référence :

ADI381-50 (50 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.

Version française

NF381-10

2020/01

ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	But de l'essai	4
2.	Pathogène.....	4
3.	Description et principe du test.....	5
III.	MATERIEL ET REACTIFS.....	6
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	6
2.	Validité et conservation.....	6
3.	Utilisation du « BTV T8 CTL+ ».....	6
4.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit	6
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....	8
1.	Précautions.....	8
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN	8
3.	Témoins à inclure	8
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION.....	10
1.	Avec le Kit QIAamp® Viral RNA.....	10
2.	Avec le Kit NucleoSpin® RNA Virus	11
3.	Avec le Kit QIAamp® 96 DNA Blood	12
4.	Avec le Kit Nucleospin® 96 Virus.....	13
5.	Avec le kit Billes magnétiques ADIAMAG.....	13
VI.	AMPLIFICATION.....	14
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS.....	15
1.	Définitions.....	15
2.	Validation et interprétation des résultats	15
A.	<i>Validation de l'essai (40 cycles)</i>	15
B.	<i>Interprétation des résultats</i>	16
VIII.	INDEX DES SYMBOLES.....	17

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	NF381-06	Modification technique	Ajout du paragraphe « Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN », en page 12, § V-5.
2014/12	NF381-07	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 17.
2014/12	NF381-07	Modification technique	Suppression de la référence ADI381-100 (100 réactions)
2016/07	NF381-08	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF381-08	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF381-08	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §I.3
2016/07	NF381-08	Modification technique	Révision du §VII.2. B interprétation des résultats
2018/06	NF381-09	Modification technique	Ajout du programme PCR court
2020/01	NF381-10	Technique	Ajout d'un tube NF water dans le kit
2020/01	NF381-10	Administratif	Modification §III. 4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME permet de détecter le Virus de la Fièvre Catarrhale Ovine (BTV) de sérotype 8 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^{èmes} 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, des épidémies graves 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 TYPE 8 REAL TIME peut détecter simultanément :

- le virus de la Bluetongue de sérotype 8 (sonde marquée en FAM)
- la GAPDH, un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ARN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome de même spectre que VIC et HEX).

Le kit ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME est compatible avec les protocoles d'extraction préconisés par l'ANSES utilisant différents kits de purification (Bio-X Diagnosits, Qiagen, Macherey-Nagel). Adia-gène 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	☒	5

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

Ce test est spécifique du sérotype 8.

Aucune réaction croisée n'a été observée avec les autres sérotypes de BTV.

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

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADI381-50

A5 solution d'amplification
BTV T8 CTL+ contrôle positif *Bluetongue Virus Type 8*
NF-Water Eau Nuclease free

1 x 1000 µl tube à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Une notice téléchargeable sur www.biox.com

2. Validité et conservation

A réception, le kit doit être stocké à **<-15°C**.

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

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Les réactifs temps réel sont sensibles à la lumière : les conserver à l'obscurité.

Le réactif « A5 » est prêt à être utilisé pour la réaction PCR.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Utilisation du « BTV T8 CTL+ »

« BTV T8 CTL+ » est un témoin positif d'amplification.

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « BTV T8 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 T8 CTL+ » dans un des 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, 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
- DMSO (dimethylsulfoxide)

- Kit d'extraction d'ARN :

- 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

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

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

- Se référer au Laboratoire National de Référence (LNR) afin d'obtenir les matériaux de références pour l'adoption des méthodes selon les Niveaux de Détection Exigés du LNR. ADIAGENE met à la disposition de ses clients un kit ADIAVET™ BTV Extraction Positive Control (Réf. : ADI352-8), matériel de référence fournisseur pouvant être utilisé comme sentinelle.
- ADIAVET™ LDpcr Positive Control – BTV (réf. : ADI352-LD) (Confirmation des performances – LDpcr du kit ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME).

IV. Traitement des échantillons et des témoins

1. Précautions

La RT-PCR ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME est compatible avec les protocoles d'extraction préconisés par l'ANSES. Adiaène 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. 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 T8 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 de sérotype 8. 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 de sérotype 8. 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.

ADIAGENE peut fournir un témoin positif cible lyophilisé, calibré entre 1 et 100xLD méthode. (ADIAVET™ BTV Extraction Positive Control Réf. : ADI352-8).

Ce témoin, ajouté à une matrice négative, peut être utilisé comme sentinelle

V. Extraction et purification

1. Avec le Kit QIAamp® Viral RNA

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)
Lyse	Placer 100 µl d'échantillon (individuel ou pool de 5) dans un microtube. Pour les témoins négatifs d'extraction, placer 100 µl de tampon PBS 1X dans un microtube.
	Ajouter 560 µl de tampon AVL + Carrier RNA . Homogénéiser ~15 secondes, vérifier si le mélange est bien homogène. Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes). Centrifuger brièvement.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 630 µl 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.
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 6 000 g.
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 3 minutes à 20 000 g.
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 14 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 40 µl de tampon AVE . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 2 minutes à 6 000 g.
Conservation	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, préchauffer le tampon RAV1 + Carrier RNA à +56°C.

	Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)
Lyse	Placer 100 µl d'échantillon (individuel ou pool de 5) dans un microtube. Pour les témoins négatifs d'extraction, placer 100 µl de tampon PBS 1X dans un microtube.
	Ajouter 560 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA préchauffé à +56°C. Homogénéiser ~15 secondes, vérifier si le mélange est bien homogène. Incuber 10 minutes à température ambiante. Centrifuger brièvement.
Préparation de la fixation	Ajouter 560 µl d'éthanol 100%. Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes). Centrifuger brièvement.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer 630 µl 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.
1 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon RAW . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
2 ^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 630 µl de tampon RAV3 . Centrifuger 1 minute à 8 000 g.
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 5 minutes à 11 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 50 µl d'eau Nuclease-free. Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 11 000 g.
Conservation	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.

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

	Sang dans un tube d'anticoagulant (EDTA)
Lyse	Placer 100 µl d'échantillon par puits d'une plaque Round-well Block. Pour les témoins négatifs d'extraction, utiliser 100 µl de tampon PBS 1X .
	Ajouter 400 µl de tampon RAV1 + Carrier RNA préchauffé à +56°C + 20 µl de protéinase K . 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.
Préparation de la fixation	Répartir 400 µl d' éthanol 100% dans une plaque MN Square-well Block. Enlever délicatement le film adhésif de la plaque Round-well Block contenant les échantillons et transférer la totalité du mélange de chaque puits dans la plaque contenant l'éthanol. Homogénéiser le mélange par aspiration-refoulement 5 fois (très important) avec une pipette multicanaux p1000.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Placer une plaque 96 Nucleospin® Virus Binding Plate (bleue) sur une nouvelle plaque MN Square-well Block. Déposer la totalité du mélange 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.
1 ^{er} lavage	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 500 µl de tampon RAW dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 2 minutes.
2 ^{ème} lavage	Enlever le film adhésif de plaque Nucleospin® Virus Binding Plate. Ajouter de 900 µl de tampon RAV3 dans chacun des puits. Placer un nouveau film adhésif Self-adhering PE Foil sur la plaque. Centrifuger 5 minutes.
Séchage de la colonne	Déposer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque 96 (type ELISA) vide et sèche. Centrifuger 10 minutes.
Elution	Placer la plaque Nucleospin® Virus Binding Plate sur une plaque Rack with MN Tube Strips. Enlever le film adhésif de la plaque. Déposer 100 µl d' eau Nuclease-free 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.
Conservation	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 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 (« BTV T8 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 T8 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 T8 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 cycleur soit programmé et démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible BTV TYPE 8 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).

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

Programme Standard		Programme 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
1 min. 60°C		30 sec. 60°C *	

* Mettre 32 secondes pour le 7500 Thermofisher

** Mettre 30 secondes pour le MX3005P

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. Interpretation des résultats

1. Définitions

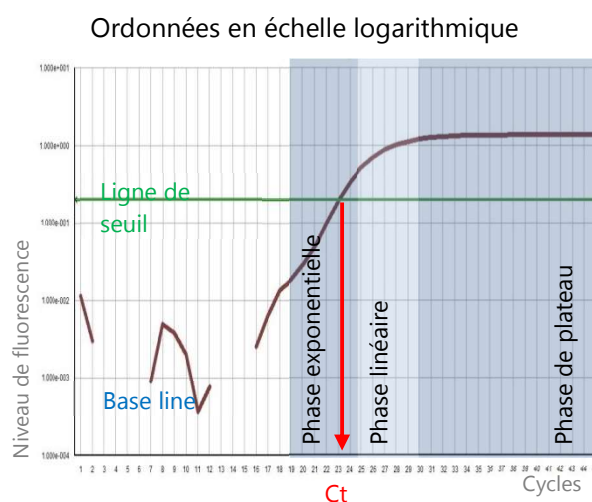
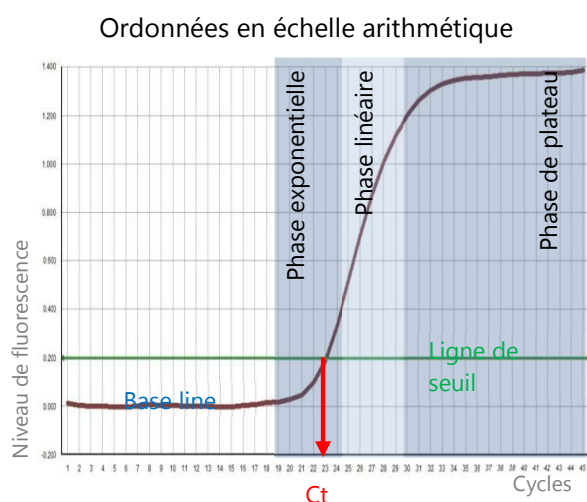
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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 (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 de sérotype 8 (en FAM) et la RT-PCR ciblant le contrôle interne (en VIC ou HEX),
- Le « BTV T8 CTL+ » présente des valeurs de Ct proches des valeurs de Ct du certificat qualité du kit.

B. Interprétation des résultats

Interprétation		Cible BTV T8 (FAM)	Contrôle interne (VIC/HEX)
<i>Cas 1</i>	Positif présence de BTV type 8	Ct < 34	Ct < 40
<i>Cas 2</i>	Négatif absence de BTV type8	Undet.	Ct < 40
<i>Cas 3</i>	Positif faible BTV type 8	34 < Ct < 40	Ct < 40
<i>Cas 4</i>	Non déterminé	Undet.	Undet.

Cas 1 : Le résultat peut être rendu comme « présence de génome du virus de la BTV de sérotype 8 ». Attention, un autre génotype du virus BTV peut-être présent dans l'échantillon testé.

Cas 2 : Le résultat peut être rendu comme « absence de génome du virus de la BTV de sérotype 8 ».

Cas 3 : L'échantillon est considéré comme « faiblement positif pour la cible BTV de sérotype 8 ». Le statut de l'infection ne peut être défini : infection très récente (début de virémie) ou ancienne (fin de virémie).

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...).

Avertissement : Ce test RT-PCR n'exclut pas la présence de virus BTV d'autres sérotypes que le sérotype 8 dans l'échantillon analysé.

En cas de résultat négatif en BTV type 8, le kit ADIAVET™ BTV REAL TIME (réf ADI352) peut-être effectué sur les ARNs extraits afin de déterminer la présence du génome du virus de la BTV d'un autre sérotype. Dans ce cas, l'interprétation des résultats est la suivante :

Interprétation		Résultats obtenus avec le Kit ADIAVET™ BTV REAL TIME (réf. ADI352)	Résultats obtenus avec le Kit ADIAVET™ BTV TYPE 8 REAL TIME (réf. ADI381)
		Cible BTV (FAM)	Cible BTV T8 (FAM)
<i>Cas 1</i>	Positif BTV type 8	Ct < 34	Ct < 40
<i>Cas 2</i>	Positif BTV, type indéterminé		Ct > 40
<i>Cas 3</i>	Positif faible BTV type 8	34 < Ct < 40	Ct < 40
<i>Cas 4</i>	Positif faible BTV, type indéterminé		Ct > 40
<i>Cas 5</i>	Négatif	Ct > 40	Sans objet

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