



MAREK REAL TIME

Référence : ADI461-100

Test pour la détection du virus de la maladie de Marek par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 réactions

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Air d'élevage (analyse par concentration dans un liquide)	✓	✗
Plume	✓	3
Chiffonnette d'environnement	✓	✗
Rate	✓	✗

* 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 ADI461 100 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
Marek CTL+	Contrôle positif du virus de la maladie de Marek	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	Contrôle exogène non-cible d'amplification	2 x 300 µL tubes à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
2021/09	NF461-05	Ajout protocoles d'extraction à partir de plume et de chiffonnette d'environnement. Ajout kit d'extraction ADIAMAG.
2024/02	V01	Passage au format simplifié. Ajout kit d'extraction ADIAPURE SLB (lyse directe) pour la recherche du virus de la maladie de Marek à partir de plume. Ajout d'un programme PCR FAST.

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

Le virus de la maladie de Marek est un virus à ADN double brin qui appartient à la famille des Herpesviridae. Il existe trois sérotypes de virus Marek. Le sérotype 1 est le seul pathogène chez le poulet et regroupe des souches plus ou moins virulentes, il inclut en particulier la souche émergence dite « very virulent » et le virus Rispens utilisé comme vaccin. Les souches des sérotypes 2 et 3 sont non pathogènes. Le virus touche plus rarement la dinde.

Les virus oncogènes sont responsables de lymphome associés à des tumeurs nerveuses ou viscérales. Les manifestations cliniques de la maladie de Marek peuvent être neurologiques (parésie, paralysie, aile pendante...), amaigrissement, anémie, lymphome (lésions nerveuses, cutanées...), morbidité atteignant environ 10%.

La transmission du virus se fait uniquement par voie horizontale (squames), directe et indirecte, essentiellement par voie respiratoire. Le virus protégé dans les cellules desquamées présente une grande résistance dans le milieu extérieur.

La présence universelle du virus Marek rend la vaccination incontournable. Pour s'assurer de l'efficacité de la vaccination, il est important de déterminer le statut des installations d'élevage avant et au moment de l'introduction des animaux.

B. Principe du test

Le test ADIAVET™ MAREK REAL TIME repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques du virus de la maladie de Marek. Il détecte simultanément en monoculture :

- Virus de la maladie de Marek (sonde marquée en FAM)
- EPC-Ext : Un contrôle interne d'extraction et d'amplification d'ADN exogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

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)

- **LD_{PCR} Positive Control – MAREK (Réf. : ADC46LD)**
Confirmation des performances – LD_{PCR} du kit.

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
ADIAPURE™ SLB	Lyse directe (à partir de plume)	500 mL : réf. ADIADP01S1-500

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiquée 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 pendant quelques heures 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
Marek 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	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext doit être ajouté dans tous les échantillons et les témoins d'extraction (sauf avec le kit d'extraction ADIAPURE SLB, l'EPC-Ext n'est pas nécessaire).

Aliquoter et conserver cette solution à <-15 °C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongelations.
Pour chaque extraction, ajouter **5 µL** d'EPC-Ext par échantillon dans le premier tampon de lyse.

3. 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).

4. 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 des échantillons et **5 µL** de contrôles 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 ADN standard		Programme ADN FAST	
2 min. 50 °C		2 min 95 °C	
10 min. 95 °C			
15 sec. 95 °C**	45 cycles	5 sec. 95 °C	45 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.

Contacter 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
Marek CTL+	Oui	Oui	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Oui	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui	Étapes 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 HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	Virus de la maladie de Marek
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui	Détecté
Oui	Non	Détecté
Non	Non	Non déterminé

« **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 1/10^{ème} en eau Nucléase-free ;

Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

Table des symboles

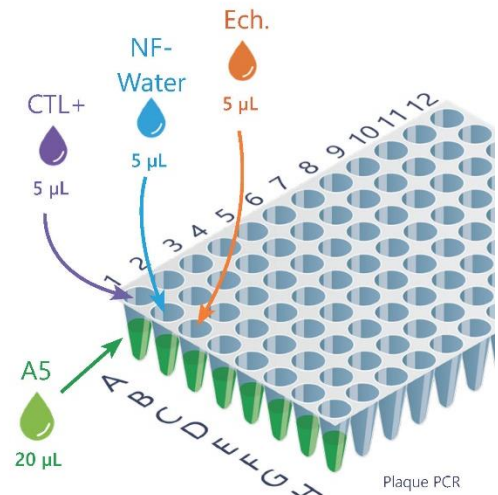
Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de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

- 1 | Extraire les acides nucléiques avec

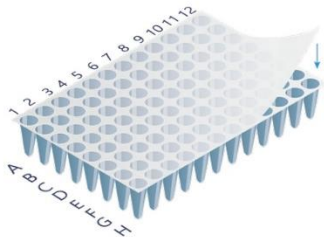


- 2 | Répartir 20 µL de réactif d'amplification A5

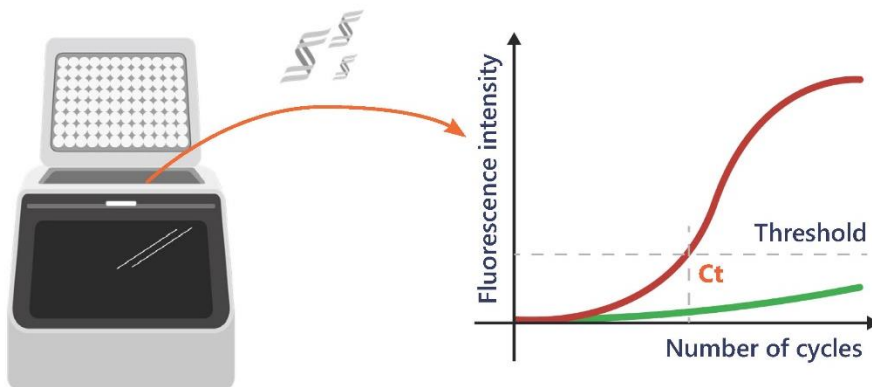
- 3 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



- 4 | Sceller les puits



- 5 | Démarrer l'analyse PCR



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