

# Adia<sup>X</sup> Vet

Notice d'utilisation  
ADI105-BVDV\_NO\_(FR)\_V01  
09/2022

## BVDV REAL TIME

Références : ADI105-100 & ADI105-500

Test pour la détection du virus de la Diarrhée Virale Bovine 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 / Sérum	✓	50
Biopsie auriculaire (sèche, humide, liquide)	✓	25
Tissu (placenta, rate, tissus fœtaux...)	✓	✗
Lait	✓	Tank

\* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer). Pour les laboratoires réalisant des analyses dans le cadre d'une qualification d'animaux non IPI (exemple : garantie ACERSA). Les LNR autorisent des tailles de mélanges définis ainsi que des techniques d'extraction définies. Se conformer à la législation en vigueur de votre pays ou organisme certificateur.

## Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI105	
		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)
BVDV CTL+	Contrôle positif BVDV	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
11/2020	NF105-14	Ancienne version
09/2022	V01	Passage au format de notice simplifié Ajout matrices boucles auriculaires humides et liquides sur boucles ALLFLEX TST-L Modification et ajout des références de kits complémentaires

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

De la famille des Flaviviridae comme le virus de l'Hépatite C, les pestivirus comprennent notamment le virus de la diarrhée bovine virale (BVDV), celui de la maladie des frontières (Border Disease Virus ou BDV) chez les ovins et de la peste porcine classique (Classic Swine Fever ou CSFV). Le BVDV est à l'origine de la maladie des muqueuses chez les bovins et génère des pertes économiques importantes dans les élevages.

De nombreux pays ont mis en place des plans d'éradication de cette maladie, impliquant une parfaite gestion des animaux infectés, ceux-ci devant être dépistés avec une grande précocité et fiabilité, en particulier les animaux infectés permanent immunotolérant (IPI).

Les tests RT-PCR permettent la détection de faibles quantités de virus BVDV dans les biopsies auriculaires, le sang, le sérum ou les organes des animaux infectés, même âgés de moins de trois mois.

## B. Principe du test

Le test ADIAVET™ BVDV 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 des pestivirus. Il détecte simultanément en monoculture :

- Les virus BVDV, BDV et certains CSFV (sonde marquée en FAM).
- RNase P : un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'un acide nucléique endogène (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 décongélations.

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 BVDV EAR (Réf. : ADC10S02). Cartilage auriculaire positive en BVDV pour contrôle d'extraction (sentinelle).**
- **Extraction Positive Control BVDV (Réf. : ADC10EPC). Témoin positif en BVDV à doper dans matrice négative pour contrôle d'extraction (sentinelle) et pour adoption de méthode.**
- **LDpccr Positive Control – BVDV (Réf. : ADC10LD) Confirmation des performances – LDpccr 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. Préparation des échantillons

Cas particulier pour les boucles TST-L d'ALLFLEX :

Dans le cas particulier d'une boucle TST-L d'ALLFLEX contenant un tampon de conservation, 2 matrices peuvent être utilisées :

- BAH (Biopsie Auriculaire Humide) : biopsie dépourvue de tampon de conservation. Dans ce cas, supprimer le tampon de conservation du tube collecteur, avant ou après l'éjection de la biopsie. Pour l'extraction, utiliser la biopsie comme matrice.
- BAL (Biopsie Auriculaire Liquide) : Tampon de conservation dans lequel a été incubée la biopsie. Dans ce cas, éjecter la biopsie dans le tampon de conservation et ajuster, si nécessaire, le volume à 250 µL avec le tampon de conservation ALLFLEX puis incuber 1 heure à température ambiante. Pour l'extraction, utiliser le tampon comme matrice.

### 2. 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
ADIAMAG LB3 buffer	Tampon pour billes magnétiques	125 mL : réf. NADI004
ADIAPURE TLB	Lyse directe	400 tests : réf. ADIADP10E1-400

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.

D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés selon les protocoles recommandés dans le dossier de validation du kit ou 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.

### 3. 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
BVDV 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 <sub>Méthode</sub> ) 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. 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.
- Replacer 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, QuantiStudio5, 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*	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	538	554
Cy5	646	662
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
BVDV CTL+	Oui	Oui/Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification
Témoin positif d'extraction	Oui	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	
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<sup>ème</sup> en eau Nucléase-free ;  
Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

#### Cas particulier des boucles auriculaires en lyse directe avec le tampon ADIAPURE™ TLB :

Les boucles auriculaires sont généralement analysées en mélange. Ce mélange peut contenir des échantillons partiellement ou totalement inhibiteurs de la réaction PCR et masquer des positifs. Ainsi pour des analyses **en lyse directe avec le tampon ADIAPURE™ TLB**, nous vous proposons le schéma d'interprétation et décisionnel ci-après :

Amplification		Interprétation & actions conseillées
FAM	HEX ou équivalent	
Non	Oui Ct<27*	Non détecté
Oui	Oui/Non	Détecté
Non	Non	<p><b>Inhibition totale :</b></p> <p><u>Analyse d'un pool</u> : tester les échantillons en individuel</p> <p><u>Analyse individuelle</u> : Tester l'échantillon pur et dilué au 1/10ème</p>
Non	Oui Ct>27*	<p><b>Partiellement inhibé :</b></p> <p><u>Analyse d'un pool</u> : tester les échantillons en individuel</p> <p><u>Analyse individuelle</u> : Tester l'échantillon dilué au 1/10ème</p>

\*Le Ct seuil du contrôle interne indiqué est une valeur indicative. Elle a été déterminée lors d'une étude sur plus de 10 000 analyses avec le protocole CLASSIC Lysis. Cette valeur peut varier en fonction des conditions opératoires et doit donc être définie pour chaque laboratoire.

## Table des symboles

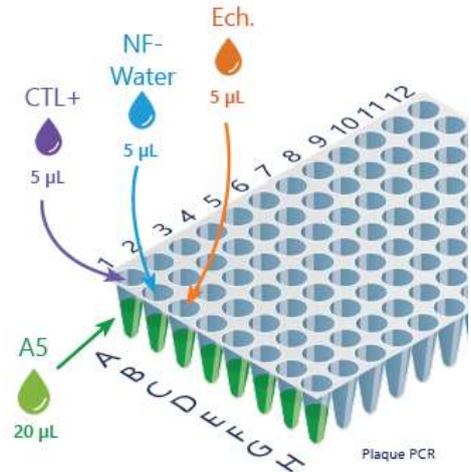
Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de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

1 | Extraire les acides nucléiques avec

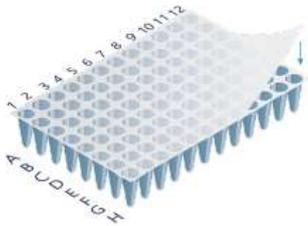


2 | Répartir 20 µL de réactif d'amplification A5

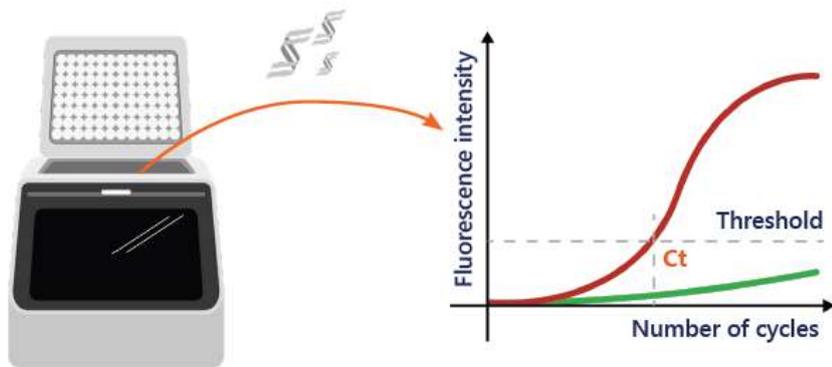
3 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



4 | Sceller les puits



5 | Démarrer l'analyse PCR



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