Notice d'utilisation
ADL67Y1-PCV2_NO_(FR)_V03
06/2024

PCV2

Référence : ADL67Y1-100

Test pour la détection du Circovirus Porcin de type 2 (Porcine CircoVirus 2) 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
Sérum	✓	5
Sang	✓	5
Organes (poumon, cœur, avorton)	✓	5

* 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
		100 réactions
A6	Solution d'amplification	1 flacon lyophilisé (A reconstituer)
Rehydration buffer	Solution de réhydratation	1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi)
PCV2 CTL+	Contrôle positif Circovirus porcin de type 2	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	2 x 1000 µL tubes à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
04/2022	V01	Passage au format simplifié
11/2022	V02	Adaptation du conditionnement en 100 réactions
06/2024	V03	Erreur sur l'intitulé du contrôle interne du test dans « §B principe du test » : contrôle interne endogène au lieu de contrôle interne exogène.

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

Les agents impliqués dans la maladie d'amaigrissement du porcelet et dans le syndrome de la dermatonéphropathie sont des virus à ADN de la famille des Circoviridés. Ils provoquent l'une des maladies majeures affectant le porc avec un impact économique significatif au niveau mondial.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ PCV2 repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques de PCV2. Il détecte simultanément en monocupule :

- Le Circovirus porcin de type 2 (sonde marquée en FAM)
- RNAse P un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

Le témoin positif PCV2 CTL+, fourni dans le kit, permet de quantifier le Circovirus Porcin de type 2.

C. Conditions de stockage

A réception, stocker le kit à +4/8 °C et au sec.
Les réactifs reconstitués doivent être aliquotés et stockés à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit.
Stocker à l'abri de la lumière.
Ne pas décongeler plus de 3 fois.

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.

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
QIAamp® DNA Mini Kit	Colonne de silice	50 tests : réf. 51304 250 tests : réf. 51306
NucleoSpin® Tissue	Colonne de silice	50 tests : réf. 740952.50 250 tests : réf. 740952.250

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 après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8 °C pendant 24 heures avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.

2. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définis 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
PCV2 CTL+ (Dilution pur à 1/10 000)	Amplification de la cible et gamme d'étalonnage	5 µL CTL+ pour chaque point de gamme 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. Préparation de la solution d'amplification A6

- Ajouter **1000 µL** de **« Rehydration buffer »** par tube de A6.
- Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes.
- 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 l'utilisation, se reporter au § « Amplification », Etape 1.

2. 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 la solution 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 l'utilisation du PCV2 CTL+ :
  - Se reporter au § « Amplification », Etape 1.
  - Dans le cas d'un test quantitatif, réaliser, extemporanément, une gamme étalon en eau Nucléase-free :

Dilution	Concentration (copies/PCR) du PCV2 CTL+
Pure	5.10^5
1/10	5.10^4
1/100	5.10^3
1/1000	5.10^2
1/10000	5.10^1

- Utiliser **5 µL** de chaque dilution dans les puits dédiés (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.
- Replacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

Etape 1 : Répartir **10 µL** de réactif d'amplification A6 dans chaque puits PCR.
Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits et **5 µL** de contrôles dans chaque puits dédié.
Utiliser 10 µL de NF-Water pour le témoin réactif.
Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptées.
Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Le programme suivant a été développé 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 ADN/ARN	
10 min. 45 °C	
2 min. 95 °C	
5 sec. 95 °C	40 cycles
30 sec. 60 °C*	

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

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	538	554
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.

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

H. Interprétation des résultats

1. Validation et interprétation des résultats qualitatifs

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

a. 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
PCV2 CTL+	Oui	Non	Amplification de la cible PCV2
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Etapes d'extraction et d'amplification

b. 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	PCV2
Non	Non	Non détecté
Oui	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 1/10ème en eau Nucléase-free ;
Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

2. Validation et interprétation des résultats quantitatifs

a. Gamme d'étalonnage

Dilution PCV2 CTL+	Concentration (copies/PCR)	Amplification		Validation de
		FAM	HEX ou équivalent	
Pure	5.10^5	Oui	Non	Amplification de la cible PCV2 et de la droite d'étalonnage
1/10	5.10^4	Oui	Non	
1/100	5.10^3	Oui	Non	
1/1000	5.10^2	Oui	Non	
1/10000	5.10^1	Oui	Non	

Pour l'interprétation quantitative des résultats, établir une droite de calibration (nombre de cycles = f (Log concentration), calculer l'équation de la droite ($y = ax + b$) et vérifier l'efficacité de la PCR ($Eff\% = \left(10^{\left(\frac{-1}{a}\right)} - 1\right) \times 100$).
La droite d'étalonnage est valide, si :

- Les 5 points de la gamme sont amplifiés. Néanmoins, un point de la gamme pourra être enlevé si ce point n'est pas l'un des 2 extrêmes.
- Le coefficient de corrélation R^2 est supérieur à 0,9.
- L'efficacité est comprise entre 75 et 125%.
- La répartition des points est homogène.

b. Interprétation de la quantification

La quantification d'un échantillon positif est possible uniquement dans le domaine de quantification de la méthode utilisée (cf. dossier de validation).

Amplification	Statut de l'échantillon pour PCV2
Aucun signal	Négatif Acide nucléique non détecté
Signal < $LQ_{METHODE}$	Positif Acide nucléique détecté en quantité inférieure à la $LQ_{METHODE}$
$LQ_{METHODE}$ < signal < LQ_{max}	Positif Acide nucléique quantifiable
Signal > LQ_{max}	Positif Acide nucléique détecté en quantité supérieure à la LQ_{max}

Lorsque l'échantillon est « quantifiable », la concentration est déterminée à l'aide de l'équation de la gamme étalon :

$$x = 10^{\left(\frac{y-b}{a}\right)} \times F$$

Où x : concentration en PCV2 (copies/PCR).
y : valeur de Ct en FAM de l'échantillon positif à quantifier.
b : origine à l'ordonnée de la droite.
a : pente de la droite.
F : facteur multiplicateur.

Le facteur multiplicateur est déterminé selon la matrice de l'échantillon et la méthode d'extraction.

Exemple de facteur multiplicateur après utilisation du kit d'extraction ADIAMAG selon la notice NFKF :

Matrice	Facteur multiplicateur (F)	Unité
Sérum/Sang	200	copies/mL
Tissu	10	copies/ mg

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 *in vitro* uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière
	Conserver au sec

Notes

1 Extraire les acides nucléiques avec

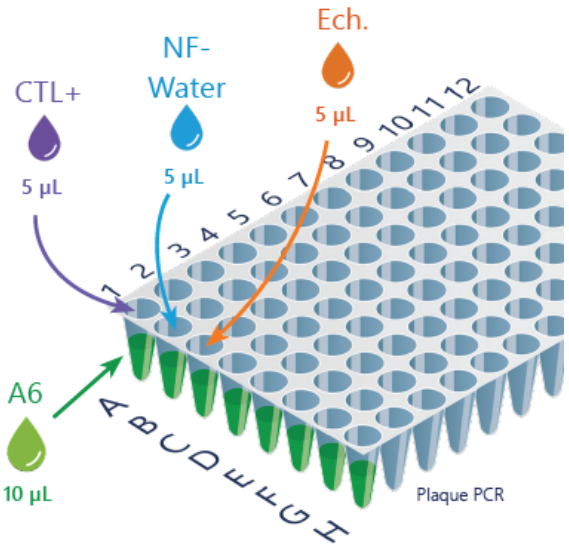
Adia X Mag

Scan me to discover Adiamag™

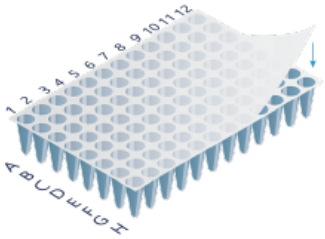
2 Ajouter **1000 µL** de Rehydration buffer au réactif d'amplification **A6**

3 Répartir **10 µL** de réactif d'amplification **A6**

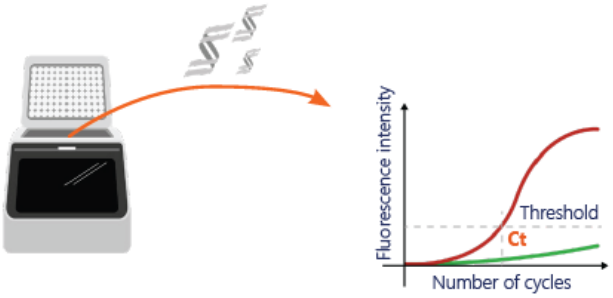
4 Distribuer **5 µL d'acides nucléiques**, **CTL+** et **NF-Water**



5 Sceller les puits



6 Démarrer l'analyse PCR



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

Contact us
support.pcr@biox.com
www.biox.com +32 (0) 84 32 23 77
Bio-X Diagnostics
38, rue de la Calestienne
5580 Rochefort (Belgium)