



CSFV

Référence : ADL22Y1-100

Test pour la détection du virus de la Peste Porcine Classique (CSFV) 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 |
|--|----------------------|---------------------------------------|
| Sang EDTA, sérum, plasma ou surnageant de culture cellulaire | ✓ | 20 |
| Rate, amygdale ou ganglion | ✓ | 10 |

* 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 ADL22Y1-100 100 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) |
| CSFV CTL+ | Contrôle positif CSFV | 1 tube à bouchon violet (A reconstituer) |
| NF-Water | Eau Nucléase Free | 1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi) |

Historique de révision

| Date | Version | Modifications |
|---------|---------|---------------|
| 01/2023 | V01 | Création |

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

La Peste Porcine Classique (CSFV) est une maladie virale contagieuse qui touche les suidés domestiques et sauvages. L'agent pathogène est un pestivirus apparenté au virus de la diarrhée bovine virale (BVDV), ou à la maladie des frontières (Border Disease Virus ou BDV). Il s'agit d'un virus à ARN.

Sous la forme aiguë, la peste porcine classique se caractérise par une forte fièvre, une perte d'appétit, des troubles de la coordination, de la diarrhée et une pneumonie ; la mort survient en 1 ou 2 semaines.

Cliniquement, il est difficile de différencier les infections dues au virus de la Peste Porcine Africaine (ASFV), d'où la nécessité d'un diagnostic différentiel en laboratoire. La PCR est un outil hautement sensible et rapide pour la mise en évidence de CSFV et sa différenciation du ASFV.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ CSFV 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 de CSFV. Il détecte simultanément en monocouple :

- CSFV (sonde marquée en FAM).
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

C. Conditions de stockage

A réception, stocker le kit à +2/8 °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.

Kits complémentaires pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **LDpccr Positive Control – CSFV (Réf. : ADC22YLD)**
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. 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 (pour tissus) | 125 mL : réf. NADI004 |

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 ou évalués sont présentés dans le dossier de validation. 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.

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 |
| CSFV 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. 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 chaque analyse, utiliser **5 µL** du CTL+ dans un des 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.

Étape 1 : Répartir **10 µL** de réactif d'amplification A6 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 5 µL de NF-Water pour le témoin réactif.

Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Le programme suivant a été développé 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/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 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 |
| CSFV CTL+ | Oui | Oui/Non | Amplification de la cible |
| Témoin négatif d'extraction | Non | Non | Absence de contamination pour l'extraction |
| Témoin positif d'extraction | Oui | Oui/Non | 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/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^{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 |
|  | Conserver au sec |

1 | Extraire les acides nucléiques avec

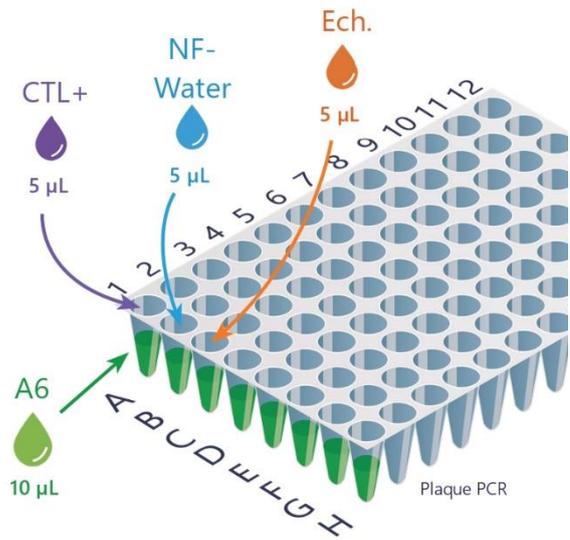


2 | Ajouter 1000 µL de Rehydration buffer au réactif d'amplification A6

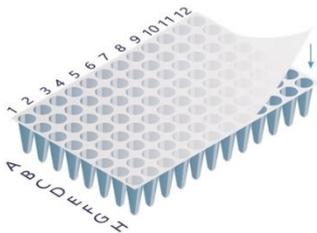


3 | Répartir 10 µL de réactif d'amplification A6

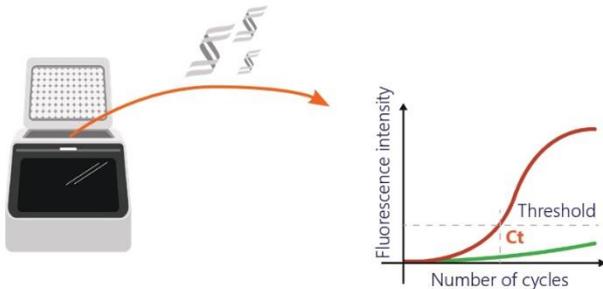
4 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



5 | Sceller les puits



6 | Démarrer l'analyse PCR



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