



EU/NA PRRSV

Référence : ADL13Y1-100

Test pour la détection, différenciation et quantification du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin EU & NA (ou PRRSV en anglais) 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 total / Sérum	✓	5
Tissu (poumon, ...)	✓	3
Fluides oraux	✓	✓
Lavage / écouvillon trachéobronchique	✓	✗
Semence	✓	✗

* 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 ADL13Y1-100
		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)
EU PRRSV CTL+	Contrôle positif PRRSV génotype EU	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
NA PRRS CTL+	Contrôle positif PRRSV génotype NA	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)

Révision documentaire

Date	Version	Modifications
05/2022	V01	Première version
08/2022	V01	Correction du tableau « Programme ADN/ARN »
10/2022	V02	Adaptation du conditionnement en 100 réactions
03/2024	V03	Ajout matrice semence et programme Lyo Boost
07/2024	V04	Modification nom OIE en WOAH. Ajout utilisation CTL+ pour analyse qualitative. Ajout du pictogramme « Sanglier »

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

L'agent responsable du Syndrome Dysgénésique et Respiratoire du Porc est un virus à ARN de la famille des Artéviridés. Il provoque l'une des maladies majeures affectant le porc avec un impact économique significatif au niveau mondial. Le virus peut être divisé en deux classes : PRRSV I (souches dites Européennes ou EU) et PRRSV II (souches dites Nord-Américaines ou NA) (Adam *et al.*, 2016 ; Kuhn *et al.*, 2016).

Deux symptômes prédominent : des troubles de la reproduction (avortements tardifs, allongement anormal de la durée de gestation, mortalité néonatale élevée, baisse de la fertilité) et des troubles respiratoires associés à de l'inappétence et de l'hyperthermie.

Le Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc s'observe aujourd'hui dans la plupart des régions du monde où l'on élève des porcs. Outre l'Europe et l'Amérique du Nord, il a été identifié en Chine en 1995, et il est présent au Japon, au Vietnam, aux Philippines, en Malaisie et en Corée. L'Australie, la Nouvelle-Zélande, divers pays d'Europe, certaines parties de l'Afrique et de l'Inde sont actuellement indemnes de la maladie (source WOAH).

La coexistence de différents génotypes de PRRSV dans les troupeaux rend le combat contre les infections compliqué. La détection rapide, efficace et pratique des différents génotypes de PRRSV devient donc cruciale pour la gestion des infections. La RT-qPCR remplit tous ces critères et représente ainsi une méthode de choix pour l'identification et le contrôle des infections par PRRSV.

B. Principe du test

Le test ADIALYO EU/NA PRRSV repose sur la transcription inverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. Cette réaction est suivie de l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques de EU PRRSV et/ou NA PRRSV. Il détecte simultanément en monocapule :

- PRRSV type EU (sonde marquée en FAM).
- PRRSV type NA (sonde marquée en Cy5).
- RNase P : un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en HEX ou équivalent).

Les témoins positifs EU PRRSV CTL+ et NA PRRSV CTL+, fournis dans le kit, permettent de quantifier PRRSV.

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 ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- 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

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 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 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
EU PRRSV CTL+ (Dilution pur à 1/10 000)	Amplification de la cible EU PRRSV et gamme étalonnage	5 µL CTL+ dans un puits par série PCR
NA PRRSV CTL+ (Dilution pur à 1/10 000)	Amplification de la cible NA PRRSV et gamme étalonnage	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	Étapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Échantillon 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 des contrôles

- 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.
- Dans le cas d'un test quantitatif, réaliser, extemporanément, des gammes étalons en eau Nucléase-free :

Dilution	Concentration du EU PRRSV CTL+ (copies/PCR)
Pure	4.10 ⁶
1/10	4.10 ⁵
1/100	4.10 ⁴
1/1000	4.10 ³
1/10000	4.10 ²

Dilution	Concentration du NA PRRSV CTL+ (copies/PCR)
Pure	2.10 ⁶
1/10	2.10 ⁵
1/100	2.10 ⁴
1/1000	2.10 ³
1/10000	2.10 ²

- Dans le cas d'une analyse quantitative, utiliser **5 µL** de chaque dilution dans les puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2). Dans le cas d'une analyse qualitative, utiliser 5 µL de la dilution 1/1000 seulement.

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 le NF-Water pour le témoin réactif.

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

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Les programmes Lyo Boost et ADN/ARN ont été développés pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantiStudio5, Step-one...) d'Applied Biosystems, pour les Mx3000, Mx3005P et 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.

Le programme Lyo Boost présente une meilleure sensibilité et est le programme recommandé pour le kit ADIALYO™ EU/NA PRRSV:

Programme Lyo Boost (Recommandé)	
20 min. 50 °C	
2 min. 95 °C	
15 sec. 95 °C	40 cycles
1 min. 60 °C*	

Note : Le programme Lyo Boost a également été validé avec les kits ADIALYO™ PCV2 et ADIALYO™ FLU A, en cas d'analyses simultanées.

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	530	549
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.

Contactez 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 les CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification			Validation de
	FAM	CY5	HEX ou équivalent	
Témoin réactif (NTC)	Non	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
EU PRRSV CTL+	Oui	Non	Non	Amplification de la cible EU PRRSV
NA PRRSV CTL+	Non	Oui	Non	Amplification de la cible NA PRRSV
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction PRRSV EU	Oui	Non	Oui	Etapes d'extraction et d'amplification PRRSV EU
Témoin positif d'extraction PRRSV NA	Oui	Non	Oui	Etapes d'extraction et d'amplification PRRSV NA

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, Cy5 et/ou HEX ou équivalent.

Amplification			Interprétation	
FAM	Cy5	HEX ou équivalent	EU PRRSV	NA PRRSV
Non	Non	Oui	Non détecté	Non détecté
Oui	Oui	Oui	Détecté	Détecté
Oui	Non	Oui	Détecté	Non détecté
Non	Oui	Oui	Non détecté	Détecté
Non	Non	Non	Non déterminé	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.

2. Validation et interprétation des résultats quantitatifs

a. Gamme d'étalonnage

Dilution EU PRRSV CTL+	Concentration (copies/PCR)	Amplification FAM	Validation de
Pure	4.10 ⁶	Oui	Amplification de la cible EU PRRSV et de la droite d'étalonnage
1/10	4.10 ⁵	Oui	
1/100	4.10 ⁴	Oui	
1/1000	4.10 ³	Oui	
1/10000	4.10 ²	Oui	

Dilution NA PRRSV CTL+	Concentration (copies/PCR)	Amplification Cy5	Validation de
Pure	2.10 ⁶	Oui	Amplification de la cible NA PRRSV et de la droite d'étalonnage
1/10	2.10 ⁵	Oui	
1/100	2.10 ⁴	Oui	
1/1000	2.10 ³	Oui	
1/10000	2.10 ²	Oui	

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 R² 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 EU PRRSV ou NA PRRSV	Statut de l'échantillon pour EU PRRSV ou NA PRRSV
Aucun signal	Non détecté Acide nucléique non détecté
Signal < LQ _{METHODE}	Détecté Acide nucléique détecté en quantité inférieure à la LQ _{METHODE}
LQ _{METHODE} < signal < LQ _{max}	Détecté Acide nucléique quantifiable
Signal > LQ _{max}	Détecté 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 copies / PCR si F est omis)

y : valeur de Ct en FAM ou Cy5 de l'échantillon positif à quantifier

b : origine à l'ordonnée de la droite

a : pente de la droite

F : facteur multiplicateur (optionnel)

Le facteur multiplicateur est déterminé selon la matrice de l'échantillon et la méthode d'extraction et permet la conversion de la quantification de copies / PCR en copies / mL ou copies / mg.

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

Références bibliographiques

- M.J. Adams, E.J. Lefkowitz, A.M. Q. King, B. Harrach, R.L. Harrison, N.J. Knowles, A.M. Kropinski, M. Krupovic, J.H. Kuhn, A.R. Mushegian, M. Nibert, S. Sabanadzovic, H. Sanfaçon, S.G. Siddell, P. Simmonds, A. Varsani, F.M. Zerbini, A.E. Gorbalenya, A.J. Davison (2016). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). Arch Virol. 161:2921-2949.
- J.H. Kuhn, M. Lauck, A.L. Bailey, A.M. Shchetinin, T.V. Vishnevskaya, Y. Bao, T. Fei Fan Ng, M. LeBreton, B.S. Schneider, A. Gillis, U. Tamoufe, J. Le Doux Diffio, J.M. Takuo, N.O. Kondov, L.L. Coffey, N.D. Wolfe, E. Delwart, A.N. Clawson, E. Postnikova, L. Bollinger, M.G. Lackemeyer, S.R. Radoshitzky, G. Palacios, J. Wada, Z.V. Shevtsova, P.B. Jahrling, B.A. Lapin, P.G. Deriabin, M. Dunowska, S.V. Alkhovsky, J. Rogers, T.C. Friedrich, D.H. O'Connor, T.L. Goldberg (2016). Reorganization and expansion of the nidoviral family Arteriviridae. Arch Virol. 161:755-768.

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
	Conserver au sec

- 1 | Extraire les acides nucléiques avec

Adia^X
Mag



Scan me to
discover Adiamag™

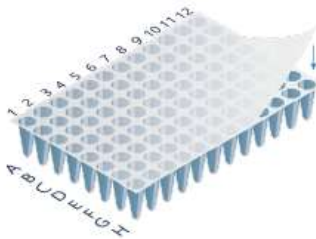
- 2 | Ajouter **1000 µL** de **Rehydration buffer**
au réactif d'amplification **A6**



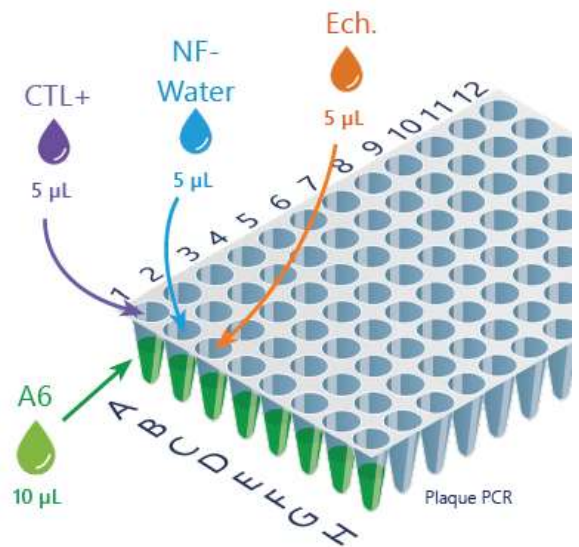
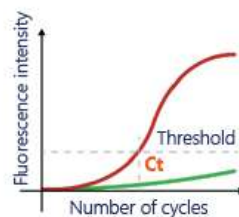
- 3 | Répartir **10 µL** de réactif
d'amplification **A6**

- 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.