

BVDV Triplex

Référence : ADL10Y1-100 & ADL10Y1-500

Test pour la détection du virus de la Diarrhée Virale Bovine par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 réactions & 500 réactions

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



| Echantillon | Analyse individuelle | Analyse en mélange*, possible jusqu'à |
|---------------------|----------------------|---------------------------------------|
| Sang/Sérum | ✓ | 20 |
| Biopsie auriculaire | ✓ | 25 |
| Tissu | ✓ | ✗ |
| 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).

Composition du kit

| Matériel fourni | | Kit ADL10Y1-100 | Kit ADL10Y1-500 |
|--------------------|---|---|---|
| | | 100 réactions | 500 réactions |
| A6 | Solution d'amplification | 1 flacon lyophilisé (A reconstituer) | 5 flacons lyophilisés (A reconstituer) |
| Rehydration buffer | Solution de réhydratation | 1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi) | 1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi) |
| BVDV CTL+ | Contrôle positif BVDV | 1 tube à bouchon violet (A reconstituer) | 2 tubes à bouchon violet (A reconstituer) |
| EPC-Ext | Contrôle exogène non-cible d'extraction | 1 flacon à bouchon jaune (A reconstituer) | 3 flacons à bouchon jaune (A reconstituer) |
| NF-Water | Eau Nucléase Free | 2 x 1000 µL tubes à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi) | 4 x 1000 µL tubes à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi) |

Historique de révision

| Date | Version | Modifications |
|---------|---------|---|
| 01/2023 | V01 | Création |
| 07/2023 | V02 | Création d'une nouvelle référence pour 500R |
| 09/2023 | V03 | Ajout matrice lait tank |

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, les tissus ou le lait des animaux infectés, même âgés de moins de trois mois.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ BVDV Triplex repose sur la transcription réverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Cette réaction est suivie de l'amplification génique de fragments d'ADNc spécifiques de BVDV/BDV. Il détecte simultanément en monocouple :

- Les virus BVDV, BDV et certains CSFV (sonde marquée en FAM).
- Un contrôle interne endogène d'extraction et d'amplification (Endogène) (sonde marquée en HEX ou équivalent).
- EPC-Ext : Un contrôle interne d'extraction et d'amplification d'acide nucléique exogène (sonde marquée en Cy5).

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)

- **Extraction Positive Control BVDV EAR (Réf. : ADC10S02).**
Cartilage auriculaire positif en BVDV pour le contrôle d'extraction (sentinelle) et pour l'adoption de méthode.
- **Extraction Positive Control BVDV (Réf. : ADC10EPC).**
Témoin positif en BVDV à doper dans une matrice négative pour le contrôle d'extraction (sentinelle) et pour l'adoption de méthode.
- **LDpccr Positive Control – BVDV (Réf. : ADC10YLD)**
Confirmation des performances – LDpccr.

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 | 125 mL : réf. NADI004 |
| ADIAPURE™ TLB | Lyse directe pour biopsie auriculaire | 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 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 |
| BVDV CTL+ | Amplification de la cible BVDV | 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 « **Rehydratation 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

a. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext doit être ajouté dans les échantillons et les témoins d'extraction. Il permet de mettre en évidence la présence de potentiels inhibiteurs de la PCR.

- Ajouter **1000 µL** de « **NF-Water** » par tube.
- 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, ajouter **5 µL** d'EPC-Ext dans le premier tampon de lyse lors de l'extraction des acides nucléiques en billes magnétiques ou colonnes de silice.

b. 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.
- Remplacer 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, 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 |
| Cy5 | 646 | 662 |
| ROX | 575 | 602 |

Note : Le Quencher est non fluorescent. Le mélange A6 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 (BVDV) | Cy5 (EPC-Ext) | HEX (Endogène) | |
| Témoin réactif (NTC) | Non | Non | Non | Absence de contamination pour l'amplification |
| BVDV CTL+ | Oui | Non | Oui/Non | Amplification de la cible |
| Témoin négatif d'extraction | Non | Oui | Non | Absence de contamination pour l'extraction |
| Témoin positif d'extraction | Oui | Oui | Oui/Non | Etapas d'extraction et d'amplification |

2. Interprétation des résultats

| Amplification | | | Interprétation |
|---------------|---------------|----------------|--|
| FAM (BVDV) | Cy5 (EPC-Ext) | HEX (Endogène) | BVDV/BDV |
| Oui | Oui | Oui | Déecté |
| Oui | Non | Oui | Déecté |
| Oui | Oui | Non | Déecté |
| Oui | Non | Non | Déecté |
| Non | Oui | Oui | Non déecté |
| Non | Non | Oui | Ininterprétable ¹ |
| Non | Oui | Non | Non déecté si matrice acellulaire ² |
| Non | Non | Non | Ininterprétable ³ |

« **Déecté** » : Dans le cas d'analyse de mélanges, refaire l'analyse individuelle de chaque échantillon du mélange pour identifier l'animal positif en BVDV/BDV.

« **Ininterprétable** » : absence de courbe d'amplification caractéristique de contrôles critiques.

Causes possibles :

¹ Problème d'extraction et/ou inhibition de la PCR.

² Échantillon dégradé ou oublié lors de l'extraction.

³ Potentielle erreur/inhibition de la PCR ou erreur lors de l'extraction.

Actions conseillées :

Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10^{ème} en eau Nucléase-free ou refaire l'extraction des acides nucléiques.

Si le test n'est toujours pas valide, redemander un autre prélèvement.

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™

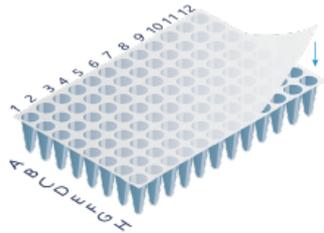
2 | Ajouter **1000 µL** de Rehydration buffer au réactif d'amplification **A6**



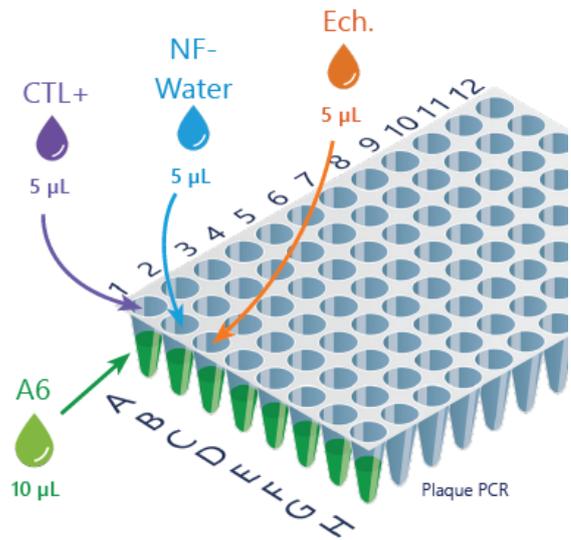
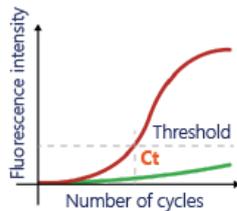
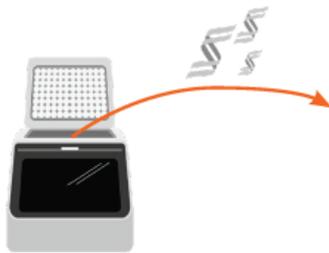
3 | Répartir **10 µL** de réactif d'amplification **A6**

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.