

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] BTV-4

Cat. N° BIOTK029 - 50 réactions

Détection des souches de type 4 du virus de la Bluetongue (BTV-4) par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène

RUMINANTS

Types de prélèvements

- Sang total (sur tube EDTA)
- Analyses individuelles

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384) programme classique 38 minutes et programme court 19 minutes.
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® BTV-4 dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® BTV all genotypes, BTV-1, BTV-3, BTV-4 et BTV-8, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® BTV-4, détaillant les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit® BTV-4.

En plus de ces 2 manuels, les dossiers de validation ainsi que le manuel de vérification des performances des Bio-T kit® BTV all genotypes, BTV-1, BTV-4 et BTV-8 sont disponibles sur demande, contacter BioSella (contact@biosellal.com).

GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous :

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	Aucun (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)	Aucun	Nouvelle adoption nécessaire
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

PRESENTATION

Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de RT-PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries/parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSellal recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

Prélèvements

Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

Envoi

Il est recommandé d'effectuer l'envoi au plus proche de la date de prélèvement, sous couvert du froid positif.

Conservation après réception

Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception ou congélation à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour quelques mois et à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ au-delà de 1 an.

Gamme Ruminants

Ce kit appartient à la gamme Ruminants qui regroupe un ensemble de kits dédiés à la détection de pathogènes responsables des affections majeures chez les ruminants, tels que : BVDV/BDV, SBV, *Mycobacterium avium paratuberculosis*...

Ces kits partagent des protocoles de PCR et de RT-PCR communs. Le Bio-T kit® BTV-4 est également compatible avec les autres kits BioSellal à l'exception des kits des gammes PIG et AVIAN (informations disponibles sur www.biosellal.com).

Description du Bio-T kit® BTV-4

Le **Bio-T kit® BTV-4** (Cat. N° BIOTK029) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- **De souches de type 4 du virus de la Bluetongue (BTV-4)** grâce à un marquage VIC,
- **D'un contrôle positif endogène IPC (GAPDH)**, grâce à un marquage Cy5, qui permet de confirmer la présence de cellules de l'hôte en quantité suffisante, de valider l'intégrité des acides nucléiques dans l'échantillon et la qualité de l'extraction ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Ce kit, basé sur une détection qualitative de BTV-4 à partir de prélèvements de type sang, a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR et selon le cahier des charges du Laboratoire National de Référence (LNR) de la Fièvre Catarrhale Ovine (ANSES Maisons-Alfort)**.

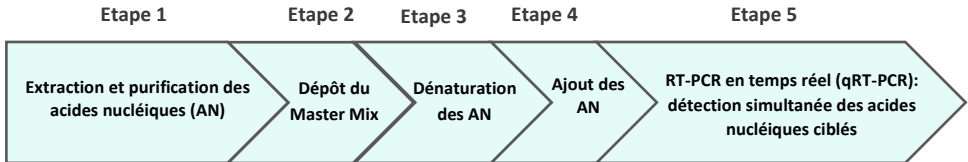
Ce kit est utilisé pour l'analyse individuelle d'échantillons de sang total trouvés positifs pour la valence BTV all genotypes à des fins d'identification du sérotype présent dans l'échantillon.

Afin de garantir la traçabilité des échantillons, BioSella recommande de réaliser sur la même analyse de qRT-PCR, une confirmation de la positivité de l'extrait, par le Bio-T kit® BTV all genotypes, et l'identification du sérotype par le Bio-T kit® BTV-4.

A cette fin, les programmes d'amplification sont communs entre tous les kits BTV. Afin de différencier les deux Master Mix, deux fluorophores différents ont été choisis : 6-FAM pour BTV all genotypes et VIC pour les kits d'identification des sérogroupes.

Si une nouvelle extraction est nécessaire, les méthodes d'extraction validées sont décrites dans le manuel commun aux Bio-T kit® BTV-4, BTV all genotypes, BTV-1, BTV-3 et BTV-8.

Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qRT-PCR



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® BTV all genotypes, BTV-4, BTV-1, BTV-3 et BTV-8		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® BTV-4			
Sang total	BioExtract® Column BioExtract® SuperBall® 38 min et 19 min	Master Mix prêt à l'emploi MMBTV4-B	Dénaturation de l'ARN double brin du BTV	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCBTV4-B)	Détecteurs : VIC/Cy5 Référence passive : ROX Programme : Classique avec RT en ramping Standard ou Fast

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMBTV4-B	500 µl	tube bouchon transparent Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification de BTV-4	EPCBTV4-B	110µl	tube bouchon rouge Sachet B	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet B	5°C ± 3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit

Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellal	BES384

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qRT-PCR, un ARN transcrit de BTV-4 (titré en nombre de copies/RT-PCR) utilisé par BioSellal dans le dossier de validation est requis.

Tableau 3. Réactif en option*

Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ARN BTV-4	ARN BTV-4 quantifié (7,5 x 10 ⁵ copies/qRT-PCR)	BioSellal	cARN-BTV-4-002

*Ce réactif est disponible uniquement sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (*a minima* : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- **Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.**
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous recommandons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- **Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la gamme Ruminants sont à ADN ou à ARN. Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN:**
 - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
 - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
 - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
 - o Utiliser des consommables « RNases free ».
 - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ ou à défaut à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
 - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

DETECTION DU BTV-4 PAR qRT-PCR AVEC LE KIT BIOTK029

Procédure globale à suivre

1) Etablir un plan de plaque définissant la position de chaque échantillon et incluant les contrôles décrits ci-dessous :

- **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction voir de prétraitement.
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait d'acides nucléiques au moment du dépôt sur la plaque qRT-PCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.
Ce contrôle est demandé par le LNR FCO afin de vérifier l'absence de contamination du Master Mix.
- **Contrôle positif d'amplification du BTV-4 (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCBTV4-B**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques du BTV-4.
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

⚠ ATTENTION : *La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur la plaque.*

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF de sang faiblement chargé est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qRT-PCR, la valeur de Ct de ce témoin d'extraction sera reportée et suivie dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, une valeur de Ct attendue avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. Dans ce cas, l'utilisation de l'EPC livré avec ce kit n'est plus obligatoire.

2) Dénaturation des acides nucléiques

L'ARN viral double brin du BTV doit être dénaturé avant de pouvoir être rétro-transcrit puis amplifié par PCR. Pour cela :

- Prélever 10 à 15 µl d'acides nucléiques extraits
- Incuber 3 minutes à 95°C ± 1.5.

- Placer les acides nucléiques, pendant au moins 5 minutes à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$, pour limiter la renaturation des doubles brins et éviter l'introduction dans le Master Mix d'une solution à température élevée qui pourrait dégrader l'enzyme Reverse-Transcriptase.

Il est très fortement recommandé d'effectuer cette étape de dénaturation juste avant la préparation de la plaque de qRT-PCR afin de prévenir la renaturation des ARN doubles brins.

3) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au « MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 10 μl de Master Mix MMBTV4-B** (tube bouchon **transparent**) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

⚠ Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.

Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 μl d'acides nucléiques extraits préalablement dénaturés (ou NCS, eau, témoin de processus, EPC: tube EPCBTV4-B, bouchon rouge)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, au contact du Master Mix et en évitant de faire des bulles.
3. Filmer la plaque avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles et de placer les acides nucléiques au contact du Master Mix.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 80 min.

4) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping Fast, AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut), QuantStudio5 (Applied Biosystems, ramping standard) et CFX96 (Bio-Rad, ramping standard). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures VIC et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

Tableau 4. Configuration du thermocycleur

	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™	QuantStudio 5	CFX96
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe	Quantitation – Standard curve	All channels
Ramping	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Fast par défaut	Ramping Standard	Ramping Standard
Référence passive	ROX	ROX	ROX	None

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur

Cible	DéTECTEURS		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
BTV-4	VIC	NFQ-MGB ou None*	15 µl = 10 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
IPC endogène	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSellal (tech@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus et EPC.

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME CLASSIQUE AVEC RT

Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	15 sec	95°C
	30 sec* + acquisition des données	60°C

* Régler sur 31 sec pour certains thermocycleurs comme l'ABI PRISM® 7500.

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des Bio-T kits® à l'exception des gammes PIG et AVIAN.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qRT-PCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations selon les paramètres définis dans l'**Annexe C de la norme NF U47-600-1**. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de RT-PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qRT-PCR est validée si les contrôles (EPC, Témoin positif de processus, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles		Interprétation
	BTV-4 (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
NC Contrôle Négatif d'amplification DEMANDE <i>PAR LE LNR FCO</i>	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau.
EPC Contrôle Positif d'amplification BTV-4 OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
Témoin positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos [†]	Pos [‡]	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli d'ajout des acides nucléiques ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Dérive du processus : extraction et/ou qRT-PCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).

† La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle.

‡ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® BTV-4. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

Rappels : L'IPC endogène a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants, il ne peut donc être détecté en qRT-PCR à partir des NCS, NC et EPC. Cependant, un léger signal peut être observé pour l'IPC dans les témoins en raison d'une réaction croisée entre la GAPDH des ruminants et la GAPDH humaine. Ce signal ne doit pas être inférieur à Ct 35.

Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles		
BTv-4 (VIC)	IPC endogène (Cy5)	Interprétation
Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos		Positif ou Détecté
Pos	Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté Absence de cellules en quantité suffisante Présence d'inhibiteurs [†] ? Compétition avec la cible ?
Neg	Neg ou Ct>35	Ininterprétable = analyse à refaire Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs [†] ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement: quantité de cellules insuffisante Problème lors de l'extraction ?

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® BTv-4. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

† En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qRT-PCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

Notes :



www.biosellal.com

Support Technique

tech@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 62

Renseignements et commandes

contact@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 60

