

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] BVDV & BHV1gE

Cat. N° BIOTK106 - 50 réactions

Détection des pestivirus des ruminants dont le virus de la diarrhée bovine (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) et du gène gE de l'Herpès virus de type 1 (Bovine Herpes Virus Type 1, BHV1gE) par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène

BOVINS

Types de prélèvements

- Liquide d'aspiration trans-trachéale (ATT)
- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)
- Lavage broncho alvéolaire (LBA)
- Organes (Poumons)
- Analyses individuelles ou en mélange jusqu'à 3 selon la matrice

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSellal

- Billes magnétiques (ex : BioSellal – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSellal – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® BVDV & BHV1gE dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions proposées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® BVDV & BHV1gE, 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® BVDV & BHV1gE.

GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en le 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 <i>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)</i>	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 diagnostiquer correctement toutes les valences de la gamme «RESPIRATORY», BioSellal recommande l'analyse d'ATT, LBA sur animal vivant et de poumon sur animal mort. Pour ce dernier prélèvement, il est important de prélever une zone comportant une partie saine et une partie lésée adjacente. L'analyse d'ENP sur animal vivant est possible mais l'interprétation des résultats doit tenir compte du contexte vaccinal pour BoRSV et PI3, et de la présence de bactéries commensales (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* et *Histophilus somni*) dans la sphère oropharyngée.

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 impératif d'effectuer l'envoi immédiatement après le prélèvement ou à défaut de le conserver à $\leq -16^{\circ}\text{C}$. L'envoi doit se faire sous couvert du froid positif en 24h.

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 RESPIRATORY

Ce Bio-T kit® appartient à la gamme RESPIRATORY qui regroupe un ensemble de kits dédiés à la détection de pathogènes responsables de troubles respiratoires qui partagent des protocoles d'extraction et de RT-PCR communs. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal à l'exception des kits des gammes PIG et AVIAN (informations disponibles sur [via contact@biosellal.com](mailto:via_contact@biosellal.com)).

En plus des kits présents dans la gamme RESPIRATORY, BioSellal propose des kits de PCR en temps réel ou d'ELISA permettant l'identification d'autres agents pathogènes potentiellement responsables des troubles respiratoires tels que BVDV ou BHV-1 séparément. Pour toute information sur les autres kits disponibles, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

Description du Bio-T kit® BVDV & BHV1gE

Le **Bio-T kit® BVDV & BHV1gE** (Cat. N° BIOTK106) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- **De tous les pestivirus des ruminants dont le virus de la diarrhée bovine** (Bovine viral diarrhoea virus, BVDV) grâce à un marquage 6-FAM,
- **Des souches terrains ou vaccinales non délété sur le gène gE de l'Herpès virus de type 1** (Bovine Herpes Virus type 1, BHV1gE) 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 réverse transcription et de la réaction d'amplification.

Tableau 1. Description des cibles virales

Cible	BVDV/BDV (FAM)	BHV1 (VIC)*
Souche terrain BHV1	Non détecté	Détecté
Souche vaccinale BHV1 gE délétée (vaccin vivant)‡	Non détecté	Non détecté
Souche vaccinale BHV1 non délétée gE (vaccin vivant)‡	Non détecté	Détecté
BVDV ou autre pestivirus des ruminants	Détecté	Non détecté
Souche vaccinale BVDV (vaccin vivant)‡	Détecté	Non détecté

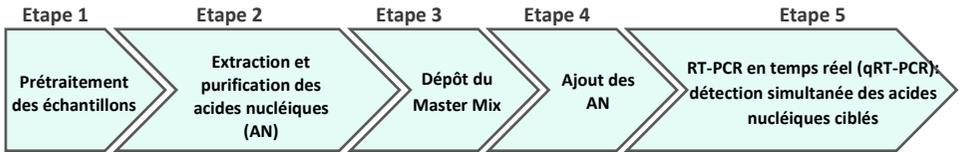
*La valence VIC détecte aussi l'Herpès Virus de Type 2 chez les cervidés de manière peu sensible. Il est rare qu'un Herpes Virus cervidés entraîne des troubles respiratoires chez le Bovin. Pour plus d'informations, contactez le support technique de BioSellal (tech@biosellal.com).

‡ Les vaccins inactivés ne sont pas détectables par qPCR.

Ce kit, basé sur une détection qualitative de BVDV et BHV1gE (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de type liquide d'aspiration trans-trachéale (ATT), lavage broncho alvéolaire (LBA), organes (Poumons) et écouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP) n'a pas fait l'objet de validation par le laboratoire expert de la BVD (LE-BVD, ANSES Niort) et le LNR de l'IBR (LNR, Anses Maisons Alfort)

Les méthodes d'extraction proposées sont décrites dans le manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY.

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



Manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® BVDV & BHV1gE		
Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)* Liquide d'aspiration trans-trachéale (ATT)* Lavage broncho alvéolaire (LBA)* Organes (poumons)*	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MMBVDBHV1-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCBVDV-BHV1-A)	Détecteurs : FAM/VIC/Cy5 Référence passive : ROX Programmes : Classique avec RT en ramping Standard

* prétraitement obligatoire

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 2. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMBVDBHV1-A	750 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 BVDV et BHV1gE	EPCBVDV-BHV1-A	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 3. Consommables et réactifs non fournis dans le kit			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSella	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSella	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSella	BES384

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

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 préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la **gamme RESPIRATORY** 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 DE BVDV ET BHV1gE PAR qRT-PCR AVEC LE KIT BIOTK106

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 recommandé lors de la 1ère utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
- **Contrôle positif d'amplification de BVDV/BDV et BHV1gE (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCBVDV-BHV1-A**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques de BVDV/BDV et de BHV1gE.
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 la matrice d'intérêt, faiblement chargé, est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qRT-PCR, les valeurs de Ct de ce témoin d'extraction seront reportées et suivies dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, des valeurs de Ct attendues pour les deux valences 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) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au « MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMBVDBHV1-A** (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°C ± 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 (ou NCS, eau, MRI ou EPC: tube EPCBVDV1-A, 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.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard. Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM, VIC et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

Tableau 4. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
BVDV/BDV	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
BHV1gE	VIC	NFQ-MGB ou None*	
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 BioSellaal (tech@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus et EPC (ADN cible de BVDV/BDV et BHV1gE).

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME CLASSIQUE AVEC RT

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

* 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.

Pour les thermocycleurs LightCycler®480 et LightCycler®96 (Roche Life Science), BioSella recommande d'utiliser le programme suivant :

Tableau 7. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN AVEC RT

Ramping Standard		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec	60°C
	+ acquisition des données	

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des kits de la gamme 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 8. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles				
	Cibles			Interprétation
	BVDV/BDV (FAM)	BHV1gE (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des trois valences Pos			Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
NC Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des trois 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 de BVDV/BDV et de BHV1gE OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TÊMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos*	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 [†]	Pos [‡]	Validé
	Neg	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).

† Les valeurs de Ct doivent être comprises 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 proposées par BioSella, sont disponibles sur demande. 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 bovins, 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 9. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
Cibles			Interprétation
BVDV/BDV (FAM)	BHV1gE (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
Neg	Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos	Pos		Positif ou Détecté
Au moins une des deux valences Pos			Positif ou Détecté pour la valence positive Négatif ou Non détecté pour la valence négative
Pos	Pos	Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté Absence de cellules en quantité suffisante Présence d'inhibiteurs† ? Compétition avec la cible ?
Au moins une des deux valences Neg		Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté pour la valence positive Ininterprétable pour la valence négative = analyse à refaire. Problème lors de l'extraction ? Présence d'inhibiteurs† ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante
Neg	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. BioSellaal 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.



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

