

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] ASFV

Cat. N° BIOTK084 - 50 réactions

Cat. N° BIOTK085 - 100 réactions

Détection du virus de la Peste Porcine Africaine (African Swine Fever, ASFV ou PPA) par PCR en temps réel (PCR) Avec contrôle positif interne (IPC) endogène

SUIDES

Types de prélèvements

- Sang total (sur tube EDTA), sérum, plasma, surnageants de culture cellulaire
- Organes (rates, amygdales, ganglions)
- Ecouvillons (sang ou exsudats)
- Analyses individuelles ou en mélanges jusqu'à 10 selon la matrice et selon le protocole d'extraction

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250, Macherey-Nagel – NucleoSpin[®] 8 Virus, Cat N° 740643)
- Colonnes de silice (ex : Cador Pathogen 96 Qiacube HT Kit Cat N°5461) uniquement pour les matrices sang, sérum, plasma et surnageant de culture cellulaire
- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

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

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® CSFV et Bio-T kit® ASFV détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® ASFV, détaillant les différentes étapes de préparation de la PCR.

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

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® ASFV sont disponibles sur demande, contacter BioSella (contact@biosella.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 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 PIG

Ce kit appartient à la gamme PIG qui regroupe un ensemble de kits qui partagent des protocoles d'extraction et de PCR communs. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal de la gamme AVIAN (informations disponibles sur www.biosellal.com).

Description du Bio-T kit® ASFV

Le **Bio-T kit® ASFV** (Cat. N° BIOTK084/BIOTK085) contient un **Master Mix prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

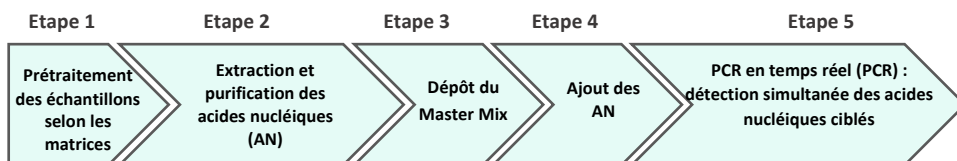
- **Du virus de la Peste Porcine Africaine** (African Swine Fever Virus, ASFV ou virus de la PPA) grâce à un marquage VIC,
- **D'un contrôle positif endogène IPC** (gapdh), grâce à un marquage Cy5, qui permet de confirmer la présence de cellules de l'hôte en quantité suffisante, de valider l'intégrité des acides nucléiques dans l'échantillon et la qualité de l'extraction ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Dans la mesure où le diagnostic différentiel de la PPA inclut celui de la PPC, BioSella a décidé de développer et de valider le Bio-T kit® ASFV en validant que l'étape de transcription-inverse (RT) nécessaire pour la détection du virus CSFV n'impacte pas les performances du Bio-T kit® ASFV et en choisissant volontairement un fluorophore différent pour les deux cibles pathogènes (6-FAM pour CSFV et VIC pour ASFV) afin d'éviter toute confusion d'identification du virus présent.

Ce kit, basé sur une détection qualitative de l'ASFV à partir de prélèvements de type sang, sérums, plasma surnageants de culture cellulaire, organes (rates, amygdales, ganglions), écouvillons de sang ou d'exsudats, 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) des Pestes Porcines Classique et Africaine (ANSES Ploufragan-Plouzané-Niort)**.

Les méthodes d'extraction validées sont décrites dans le manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® ASFV et Bio-T kit® CSFV.

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



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® ASFV et aux Bio-T kit® CSFV		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® ASFV		
Sang, sérum, plasma Organes (rate, amygdales, ganglions)* Ecouvillons (sang ou exsudat)* Surnageant de culture cellulaire	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Column NucleoSpin® 8 Virus Cador Pathogen 96 Qiacube HT ¹	Master Mix prêt à l'emploi MMASFV-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCASFV-A)	Détecteurs : VIC/Cy5 Référence passive : ROX Programme : PIG/AVIAN ± RT en ramping Fast ou Standard

* prétraitement obligatoire, ¹ : uniquement pour sang total, sérum, plasma et surnageant de culture cellulaire.

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit

Description	Référence	Volume/tube		Présentation	Conservation
		BIOTK084 50 réactions	BIOTK085 100 réactions		
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMASFV-A	750 µl	2x750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification de l'ASFV	EPCASFV-A	110 µl	110 µl	tube bouchon orange 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°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSellal	ATL19076
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
NucleoSpin® 8 Virus	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (12*8)	Macherey Nagel	740643
Cador Pathogen 96 Qiacube HT kit	Kit d'extraction ADN/ARN format plaques (x5)	Qiagen	5461

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 PCR, l'ADN standard de l'ASFV (titré en nombre de copies/PCR) utilisé par BioSella dans le dossier de validation est requis. L'EPC fourni dans le Bio-T kit® (tube bouchon **orange**) peut également être utilisé. Cependant, en raison de l'impact des cycles de congélation/décongélation, BioSella recommande l'utilisation du produit compagnon commercialisé sous la référence suivante :

Tableau 3. Réactif en option*

Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ADN ASFV	ADN ASFV quantifié (1,5 x 10 ⁴ copies/PCR)	BioSella	cADN-ASFV-001

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

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (à 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 PCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque PCR), « 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 ≤-16°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- 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.

DETECTION DE L'ASFV PAR PCR AVEC LES KITS BIOTK084/BIOTK085

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, voire 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 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 l'ASFV (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCASFV-A**, bouchon **orange**), contenant les séquences cibles spécifiques de l'ASFV.
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, sérum, d'organe (rate, amygdale, ganglion), d'écouvillon (sang ou exsudat) ou de surnageant de culture cellulaire faiblement chargé est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après 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 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) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMASFV-A** (tube bouchon **blanc**) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau, témoin de processus ou EPC: tube EPCASFV-A, bouchon orange)** 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 70 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 et ramping Fast et sur Rotor-Gene Q (QIAGEN). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lecture VIC et CY5. Pour d'autres thermocycleurs, 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 ou Ramping Fast	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
ASFV	VIC	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 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 (ADN cible de l'ASFV).

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN SANS RT [†]		
Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec	60°C
	+ acquisition des données	

[†] La réalisation d'une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR pour l'amplification des génomes à ARN n'a pas d'incidence sur l'efficacité du Bio-T kit® ASFV (données présentées dans le dossier de validation disponible sur demande). Ainsi, pour le diagnostic différentiel des pestes porcines, il est possible d'analyser simultanément CSFV et ASFV sur le même run de RT-PCR.

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 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 PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de 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
	ASFV (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 FACULTATIF	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 de l'ASFV OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la 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 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 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® ASFV. 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 suidés, il ne peut donc être détecté en PCR à partir des NCS, NC et EPC.

Lecture des Echantillons extraits

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

Cibles		
ASFV (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 dans l'échantillon [†] ? 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 Biosellal, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® ASFV. Biosellal 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 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.

[#] : pour les mélange de sang : au moins un des animaux est détecté ou positif en ASFV



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

