

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] CSFV

Cat. N° BIOTK058 - 50 réactions

Cat. N° BIOTK060 - 100 réactions

Détection du virus de la Peste Porcine Classique (Classical Swine Fever Virus, CSFV ou PPC) par RT-PCR en temps réel (RT-PCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène

SUIDES

Types de prélèvements

- Sang total (sur tube EDTA), sérum, plasma, surnageant de culture cellulaire
- Organes (rates, amygdales, ganglions)
- Ecouvillons (sang ou exsudats)
- Analyses individuelles

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250 ; Qiagen – RNeasy[®] Mini Kit Cat N° 74104 ; Macherey-Nagel – NucleoSpin[®] RNA, Cat N° 740955 ; Macherey-Nagel – Nucleospin[®] 8 Virus, Cat N°740643)
- Colonnes de silice (ex : Cador[®] Pathogen 96 QIAcube[®] HT Kit Cat N° SP54161) uniquement pour les matrices sang, sérum, plasma, surnageant de culture cellulaire
- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384 programme classique 38 minutes et programme court 19 minutes).

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® CSFV 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 BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® CSFV, détaillant les différentes étapes de préparation de la RT-PCR.

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

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® CSFV sont disponibles sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

GESTION DES REVISIONS

BioSellal 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 PIG

Ce kit appartient à la gamme PIG qui regroupe un ensemble de kits qui partagent des protocoles d'extraction et de RT-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® CSFV

Le Bio-T kit® CSFV (Cat. N° BIOTK058/BIOTK060) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- Du virus de la peste porcine classique (**Classical Swine Fever Virus, CSFV ou PPC**) grâce à un marquage 6-FAM,
- D'un **contrôle positif endogène IPC** (beta actine), 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.

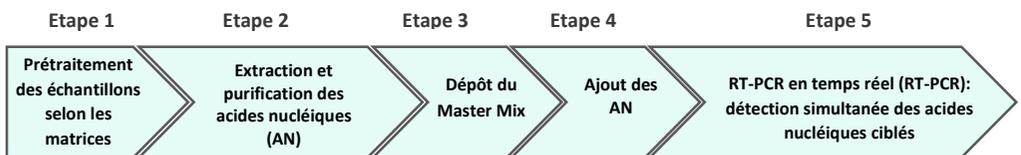
Ce kit est basé sur une détection qualitative de CSFV (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de type sang total, sérum, plasma, surnageant de culture cellulaire, organes (rates, amygdales, ganglions) et écouvillons (sang ou exsudats). Il a été développé et validé suivant les prescriptions 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 (PPC/CSF) et Africaine (PPA/ASF) (ANSES Ploufragan-Plouzané)**.

Note : Afin d'apporter une meilleure détection de l'IPC endogène dans des matrices potentiellement pauvres en cellules telles que les écouvillons, la composition du Master Mix du Bio-T kit® CSFV a été modifiée. La nouvelle référence du Master Mix **MMCSFV-B** est une modification majeure de niveau 1. La validation des performances de cette nouvelle composition de Master Mix est présentée dans l'addendum au dossier de validation.

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

Afin de faciliter le diagnostic différentiel des pestes porcines, BioSella a validé des protocoles d'extraction et de RT-PCR communs aux **Bio-T kit® CSFV et Bio-T kit® ASFV**.

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



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® CSFV et Bio-T kit® ASFV		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® CSFV		
Organes (rates, amygdales, ganglions) ¹ Sang total, sérum, plasma, surnageant culture cellulaire ² Ecouvillons ³	BioExtract® SuperBall® (38 et 19 minutes) BioExtract® Column RNeasy® Mini Kit NucleoSpin® RNA Cador® Pathogen 96 QIAcube® HT Kit ³ NucleoSpin® 8 virus	Master Mix prêt à l'emploi MMCSFV-B	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCCSFV-A)	Détecteurs : FAM/Cy5 Référence passive : ROX Programme : PIG/AVIAN avec RT en ramping Standard ou Fast

¹ : prétraitement requis, ² : aucun prétraitement requis, ³ : 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
		BIOTK058 50 réactions	BIOTK060 100 réactions		
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMCSFV-B	750 µl	2x750 µl	tube bouchon transparent Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification du CSFV	EPCCSFV-A		110 µl	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°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSella	ATL19076
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
RNeasy® Mini Kit	Kit d'extraction ARN format colonne (50)	Qiagen	74104
NucleoSpin® RNA	Kit d'extraction ARN format colonne (50)	Macherey Nagel	740955
Cador® Pathogen 96 QIAcube® HT kit	Kit d'extraction ADN/ARN format plaques (x5)	Indical	SP54161
NucleoSpin® 8 Virus	Kit d'extraction ARN format colonne (12*8)	Macherey Nagel	740643

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 RT-PCR, un transcrit d'ARN du CSFV (titré en nombre de copies/RT-PCR) utilisé par BioSellal dans son dossier de validation est requis. BioSellal commercialise ce réactif sous la référence suivante :

Tableau 3. Réactifs en option*			
Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ARN CSFV	ARN CSFV quantifié (6 x 10 ³ copies/RT-PCR)	BioSellal	cARN-CSFV-001

*Ce réactif est disponible uniquement sur demande, contacter BioSellal (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 MM 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 ≤-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.
- Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la **gamme PIG** 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 ≤-65°C ou à défaut à ≤-16°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 CSFV PAR RT-PCR AVEC LES KITS BIOTK058/BIOTK060

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 RT-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 du CSFV (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCCSFV-A**, bouchon **rouge**), contenant la séquence cible spécifique du CSFV.
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 RT-PCR, la valeur de Ct de ce témoin d'extraction sera reportée et suivie dans le temps sur une carte contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et RT-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 MMCSFV-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°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, témoin de processus ou EPC : tube EPCSFV-A bouchon rouge)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, dans le 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.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 90 min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast en ramping Standard et Fast et sur Rotor-Gene Q (QIAGEN). Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM 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 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	
CSFV	FAM	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 BioSellaal (tech@biosellaal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), MRI et EPC (ADN cible de CSFV).

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN AVEC RT		
Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 s	95°C
	45 s	60°C
	+ acquisition des données	

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des kits des gammes PIG et AVIAN.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après RT-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, à 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 RT-PCR est validée si les contrôles (EPC, Contrôle 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
	CSFV (FAM)	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 du CSFV OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la RT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
Contrôle positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos [†]	Pos [‡]	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la RT-PCR: Erreur de Master Mix ? Oubli d'ajout de l'AN ou dépôt non au contact du MM lors de la préparation de la plaque ? Dérive du processus : extraction et/ou RT-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® CSFV. 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 RT-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		
CSFV (FAM)	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 BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® CSFV. 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 RT-PCR en prédiluant l'AN extrait 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

