

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit® Peste des Petits Ruminants

Cat. N° BIOTK044 - 50 réactions

**Détection du virus de la Peste des Petits Ruminants
(PPRV)
par qRT-PCR en temps réel
avec contrôle positif interne (IPC) ARNm endogène**

Types d'échantillons

- Ecouvillons oculaires et nasaux pendant le pic d'hyperthermie ; organes (poumons, rate, intestin, nœuds lymphatiques) chez les ovins - caprins
- Sang total sur tube EDTA chez les caprins
- Analyses individuelles
- Conservation à 4°C jusqu'à 4 jours ou congelé à <-20°C avant analyse

Extractions d'ARN recommandées

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

D'autres kits d'extraction sont utilisables: contacter notre support technique pour information.

Réservé à l'usage vétérinaire



PRESENTATION

Description du Bio-T kit® Peste des Petits Ruminants

La technique de qRT-PCR en temps réel permet de révéler la présence d'acides nucléiques cibles de façon précise et rapide. Le Bio-T kit® Peste des Petits Ruminants est une qRT-PCR duplex permettant de détecter simultanément dans la même réaction la présence des quatre génotypes du morbillivirus de la PPR (marquage 6-FAM) et de vérifier la qualité de l'extraction des acides nucléiques et de l'amplification par la présence d'un contrôle positif interne (IPC) ARNm endogène (marquage Cy5),

Ce kit est utilisable pour l'analyse individuelle de sang total de caprins ou d'écouvillons oculaires et nasaux et d'organes de petits ruminants.

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

Etape 1 :

Après une étape de pré-traitement pour les écouvillons et les organes, deux protocoles d'extraction et de purification des acides nucléiques sont proposés :

- sur colonnes de silice avec le kit **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)**
- ou sur billes magnétiques avec le kit **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)**

Il est obligatoire d'inclure un échantillon « **contrôle négatif de processus** » (**NCS**) afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons sur l'ensemble de l'analyse. Pour réaliser ce contrôle, la prise d'essai de sang ou de sérum est remplacée par de l'eau ou du PBS « RNase/DNase free », et sera traitée en parallèle des échantillons d'intérêt.

Etape 2 :

Dépôt du Master Mix dans les puits de la plaque ou des barrettes de qRT-PCR

Etape 3 :

Ajout des lysats ou des extraits d'ARN

Etape 4 :

qRT-PCR en temps réel : rétro-transcription simultanée des ARN viraux et de l'ARNm de l'IPC endogène en ADN complémentaires puis amplification par qPCR.

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	MMPPR-A	750 µl	1 tube bouchon transparent Sachet A	-20°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) = contrôle positif d'amplification PPRV à 10 ³ copies/qRT-PCR	EPCPPR-A	110 µl	1 tube bouchon rouge Sachet B	-20°C Zone « Ajout d'ARN »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	1 tube bouchon bleu Sachet B	4°C ou -20°C Zone « Ajout d'ARN »

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.

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (blouse, gants jetables changés fréquemment).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction, stockage des acides nucléiques extraits), « Mix » (stockage des MM prêt à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'ARN » (zone post-Mix, addition des AN extraits et contrôles dans la plaque qPCR), « qPCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex, portoirs...).
- Utiliser des pointes à filtre.
- Décongeler tous les réactifs stockés à -20°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger rapidement (centri-boule) tous les réactifs avant utilisation.
- 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...).
- Eviter de multiplier les cycles de congélation-décongélation des échantillons, des lysats, des ARN extraits.

Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit pour la partie qPCR			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellaI	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellaI	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellaI	BES384

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

Liste des réactifs en option

Pour les adoptions de qRT-PCR et de méthode, l'ARN transcrit de PPRV titré en nombre de copies/qRT-PCR utilisé par BioSellaI dans son dossier de validation doit être utilisé. BioSellaI commercialise ce réactif sous la référence suivante :

Tableau 3. Réactifs en option*			
Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ARN PPR	ARN quantifié PPR (30 000 LDqRT-PCR)	BioSellaI	cARN-PPRV001

*Ce réactif est disponible uniquement à la demande, contacter BioSellaI (contact@biosellal.com).

EXTRACTION D'ARN

BioSellaI propose deux kits d'extraction :

- **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)** basé sur l'utilisation de colonne de silice, préconisé pour l'extraction de 1 à 24-30 échantillons en parallèle.
- **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)** basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation d'automates tels que le KingFisher™ Duo, mL ou Flex, préconisé pour l'extraction en parallèle de 12 échantillons ou plus.

Un protocole simplifié pour chaque méthode vous est proposé ci-dessous. Pour plus d'informations, contacter notre support technique ou se reporter au manuel d'utilisation dédié sur www.biosellal.com.

Prétraitement des écouvillons nasaux et oculaires :

Prétraitement des écouvillons avant extraction et purification des acides nucléiques en colonnes de silices ou billes magnétiques

(Analyses individuelles ou pool d'écouvillons du même animal)

Déposer 1ml de PBS stérile dans un microtube.

Ajouter la tête de l'écouvillon sec après avoir sectionné la tige (possibilité de pooler les écouvillons oculaires et nasaux d'un même animal) - Fermer le capuchon du tube.

Vortexer quelques secondes - Centrifuger rapidement.

Retirer l'écouvillon en l'écrasant sur le bord du microtube pour récupérer le maximum d'éluat.

Prélever **200µl** de l'éluat pour une extraction et une purification des acides nucléiques selon les protocoles **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050)** ou **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)** décrits ci-après.

Congeler le reliquat d'éluat à <-20°C pour renouveler éventuellement l'extraction.

Prétraitement des organes:

Prétraitement des organes avant extraction et purification des acides nucléiques en colonnes de silices ou billes magnétiques

Placer les fragments de tissus frais d'un même animal dans un contenant stérile (par exemple boîte de Pétri) et procéder à une dissection fine à l'aide d'un scalpel stérile.

Prélever entre 20 et 30 mg de tissu dans un microtube et procéder à l'extraction et à la purification des acides nucléiques selon les protocoles **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050)** ou **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)** décrits ci-après.

Si les organes ont été congelés, une extraction directe sans prétraitement peut être réalisée à partir de 200µl d'exsudat de décongélation.

Extraction sur colonnes :

Kit BioExtract® Column

Cat. N° BEC050 ou BEC250

1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

Dans un tube de 1.5 ml (non fourni) : ajouter 20 µl de Protéinase K.

Ajouter dans ce tube :

- pour les échantillons de sang total : 100 µl d'échantillon individuel préalablement vortexé.
- pour les écouvillons : 200µl d'éluat dans du PBS.
- pour les organes : 20 à 30 mg de tissu frais disséqués ou 200µl d'exsudat de décongélation

Ajouter dans le tube 100 µl de solution de lyse LA-carrier. Voir tableau 4 ci-dessous pour la solution de lyse LA-carrier :

Tableau 4. Solution de lyse LA-carrier

Réactif	Nombre d'échantillons				
	1	6*	12*	24*	30*
Buffer LA	100 µl	660 µl	1.32 ml	2.64 ml	3.3 ml
« Carrier RNA » (1 µg/µl)	1 µl	6.6 µl	13.2 µl	26.4 µl	33 µl

* Afin de compenser les erreurs de pipetages, le volume préparé est de 110% du volume requis.

Vortexer et incuber 15 min à 20–25°C (à température ambiante).

Centrifuger brièvement (centri-boule) puis ajouter 350 µl de Buffer LB.

Vortexer puis centrifuger brièvement (centri-boule).

2. Adsorption sur la membrane de silice

Transférer délicatement la totalité du volume (570 à 670 µl) sur la colonne BioExtract® Mini Spin Column (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).

Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min. Changer de tube collecteur (Mettre la colonne BioExtract® dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter 600 µl de Buffer W1.

Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min. Changer de tube collecteur.

Ajouter 600 µl de Buffer W2.

Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min. Changer de tube collecteur.

Centrifuger à 20 000 x g pendant 2 min pour sécher la membrane.

4. Elution des acides nucléiques

Mettre la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube de 1.5 ml (non fourni), et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter 60 µl de Buffer EL (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.

Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant 1 min.

Centrifuger à 20 000 x g pendant 1 min.

Transférer l'éluat (60 µl) dans un tube étiqueté ou conserver l'éluat contenu le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

L'ARN extrait peut être conservé à 4°C si la qRT-PCR est lancée dans l'heure qui suit, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C pendant 6 mois ou à <-70°C pour une meilleure conservation.

Figure 1. Extraction avec le kit BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)

1 Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption	 20 µl de protéinase K 100-200 µl d'échantillon* 100 µl de solution de lyse LA-carrier (Pour 1 : 100 µl Buffer LA / 1 µl carrier RNA) Température ambiante (TA) 15 min 350 µl de Buffer LB
2 Adsorption sur la membrane de silice	 Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement  6 000 x g 1 min
3 Lavages Séchage de la membrane de silice	 1^{er} Lavage600 µl W1 2nd Lavage600 µl W2 -  6 000 x g 1 min  6 000 x g 1 min  20 000 x g 2 min
4 Elution des acides nucléiques	 60 µl de Buffer EL (TA) délicatement TA 1 min  20 000 x g 1 min

* Le volume de prise d'essai de l'échantillon dépend de la matrice d'intérêt à extraire.

Extraction avec billes magnétiques :

Kit BioExtract® SuperBall®

Pour utilisation avec automates KingFisher™ Flex, Duo ou mL
Cat. N° BES384

1. Préparation des plaques ou barrettes

Préparer les consommables pour la série d'extraction :

Flex : 4 plaques Deep-wells et 2 microplaques. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter (voir Tableau 6).

Duo : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'éluion.

mL : 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

Déposer au fond des puits de la « Deep-well Lysat » (Flex), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL) :

20 µl de protéinase K.

100-200 µl d'échantillon préalablement vortexé (cf Protocole colonnes).

500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier préalablement vortexée vigoureusement (30 sec).

Voir tableau 5 ci-dessous pour la solution de lyse LAB-SMB-carrier :

Tableau 5. Solution de lyse LAB-SMB-carrier							
Réactif	1	5	10	12	15	48	96
Buffer LA	100 µl	500 µl	1 ml	1.3 ml	1.6 ml	4.9 ml	9.7 ml
Buffer LB	400 µl	2 ml	4 ml	5.2 ml	6.4 ml	19.6 ml	38.8 ml
SMB (SuperBall Magnetic Beads)†	25 µl	125 µl	250 µl	325 µl	400 µl	1,225 ml	2,425 ml
'Carrier RNA' (1 µg/µl)	1 µl	5 µl	10 µl	13 µl	16 µl	49 µl	97 µl

* Pour compenser les erreurs de pipetage, pour un nombre d'échantillons supérieur à 11, il est recommandé de préparer la solution pour n+1 échantillons. Le volume de tampon en excès peut être conservé en vue d'une utilisation sous 8 jours ; au-delà de cette durée, il doit être jeté.

† Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes avant la première utilisation ou 1 minute pour les utilisations suivantes.

Distribuer les autres réactifs, selon le tableau 6 ci-dessous :

Tableau 6. Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, Duo et mL				
Position sur la barrette ou la plaque			Elément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex	Duo*	mL		
Deep-well Lysat	Ligne A	Position A	Lysat†	620
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Buffer W1	700
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Buffer W2	700
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Ethanol (96-100%)	750
Microplaque Elution	Elution strip	Position E	Buffer EL	60
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	A positionner manuellement	Peigne	—

* Les lignes C, D et H sont vides

† Inclus 20 µl de Protéinase K, 100 µl d'échantillon et 500 µl de solution lyse LAB-SMB-carrier.

2. Lancement du KingFisher™

Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « BioExtract_KF_Flex », « BioExtract_KF_Duo » ou « BioExtract_KF_mL » et démarrer.

En fin de programme, récupérer les éluats.

L'ARN extrait peut être conservé à 4°C si la qRT-PCR est lancée dans l'heure qui suit, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C pendant 6 mois ou à <-70°C pour une meilleure conservation.

Figure 2. Extraction avec le kit BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)

	KingFisher™ Flex	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Elément à ajouter
1 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Lysat 	Ligne A 	Position A 	<u>Lysat</u> 20 µl de Protéinase K 100-200 µl d'échantillon* 500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier (Pour 1: 100 µl Buffer LA / 400 µl Buffer LB / 25 µl SMB / 1 µl carrier RNA) 700 µl de Buffer W1 700 µl de Buffer W2 750 µl d'éthanol (96-100%) 60 µl de Buffer EL Peigne (Rod Cover)
	Deep-well Wash 1 	Ligne E 	Position B 	
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	
	microplaque Elution 	Elution strip 	Position E 	
	microplaque Peigne 	Ligne B  (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement	
2 KingFisher™	- Allumer le KingFisher™ Flex, Duo ou mL. - Ouvrir la porte du couvercle protecteur. - Sélectionner le programme "BioExtract_KF_Flex", "BioExtract_KF_Duo" ou "BioExtract_KF_mL" à l'aide des touches fléchées. - Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil.			

* Le volume de prise d'essai de l'échantillon dépend de la matrice d'intérêt à extraire.

Pour obtenir le programme KingFisher™ correspondant à la version de l'automate, veuillez contacter notre support technique (tech@biosella.com)

DETECTION DU VIRUS DE LA PPR par qRT-PCR Avec le Bio-T kit® Peste des Petits Ruminants

Procédure globale à suivre

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 remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction.
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : l'eau remplace l'extrait ARN au moment du dépôt sur plaque qPCR.
Ce contrôle est recommandé lors de la 1^{ère} utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du master mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
- **Contrôle positif de détection du virus de la PPR (EPC – tube bouchon rouge)** : ADN synthétique fourni à 10^3 copies/qRT-PCR.
Ce contrôle est obligatoire sauf en présence d'un contrôle positif de processus.
- **Contrôle positif de processus « sentinelle » MRI**, un échantillon POSITIF de la matrice d'intérêt (sang, écouvillon, organes) est extrait en même temps que les échantillons analysés. Après qRT-PCR, le Ct/Cq de ce témoin positif d'extraction sera reporté et suivi dans le temps sur une carte contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, un Ct/Cq attendu avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. Dans ce cas, l'EPC livré avec ce kit n'est plus obligatoire.

Préparation extemporanée de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

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

Dans la zone dédiée à l'ajout de l'ARN

2. **Ajouter 5µl d'ARN extrait (ou NCS ou eau ou EPC)** 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 ou fermer les micro-tubes** avec le film ou les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir § Paramètres de réglage du thermocycleur, tableaux 7 et 8).
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 75 min.

Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé et validé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied BioSystem) et AriaMx™ (Agilent).

	ABI PRISM® 7500 Fast	ABI PRISM® 7500	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Standard par défaut	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX	ROX

Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

Tableau 7. Paramètres de réglage du thermocycleur

Cible	Détecteurs		Volume final/ puits
	Reporter	Quencher	
PPRV	FAM	NFQ-MGB ou None*	20µl = 15µl MM + 5µl ARN extrait ou contrôles†
IPC	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 BioSella (tech@biosella.com)

† Les contrôles sont les NC (=eau), NCS (=eau extraite) et EPC (ADN cible PPRV) ou MRI.

Tableau 8. Paramétrage du PROGRAMME

Thermocycleurs	• ABI PRISM® 7500 Fast • ABI PRISM® 7500 • AriaMx		
	Ramping Standard ou Fast		
	Cycles	Temps	Température
	1 cycle	20 min	50°C
	1 cycle	5 min	95°C
40 cycles		15 s *	95°C
		30 s	60°C
		+ acquisition des données	

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qPCR, 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.

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 9. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles			
	Cibles		Interprétation
	PPRV (FAM)	IPC endogène (Cy5)	
NCS = Ctl Neg de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Validé
	Neg / Pos	Pos	Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de plaque.
NC = Ctl Neg d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Validé
	Neg / Pos	Pos	Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de plaque ou contamination du Master Mix.
EPC = Ctl Pos de détection du PPRV OBLIGATOIRE EN ABSENCE DE L'ECHANTILLON SENTINELLE	Pos Ct conforme au CQ	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.

Lecture des Echantillons extraits

Tableau 10. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons		
Cibles		Interprétation
PPRV (FAM)	IPC endogène (Cy5)	
Neg	Pos	Négatif ou Non détecté
Pos	Ct compris dans l'intervalle du dossier de validation	Positif ou Détecté
Pos	Neg ou Ct tardif	Positif ou Détecté - Présence d'inhibiteurs de la qRT-PCR? - Compétition avec la cible ?
Neg	Neg ou Ct tardif	Ininterprétable - Oubli d'addition d'ARN extrait ou dépôt non au contact du MM lors de la préparation de la plaque ? - Présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ? - Dégradation des ARN dans l'échantillon ?

Lorsque des inhibiteurs de la qRT-PCR sont suspectés, procéder à une nouvelle analyse après avoir dilué l'extrait d'ARN au 1/10^{ème} ou renouveler l'extraction en diluant la prise d'essai au 1/10^{ème}.



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

