

Mix prêt à l'emploi : Simplicité, Rapidité ! ...

PCR License

This product is offered under a licence for the manufacture and the sale of veterinary PCR products from ROCHE. The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing veterinary in vitro diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

Kit TaqVetTM Swine Influenza A A/H1N1/2009 included

réf : INFAP-Swine

Pour détection du virus de l'influenza A chez les porcs dans :

Écouvillon nasal

Organes (Poumons)

Liquide broncho alvéolaire

Surnageant de culture cellulaire

Liquide allantoïdien

**par utilisation de sondes TaqMan[®]
en PCR temps réel**

Réactif soumis à la validation du LNR Virus Influenza Porcins (ANSES - Site de Ploufragan) et préconisé au réseau de laboratoires publics agréés par la DGAL

Modifications de la notice :

Page 5 et 15 : contrôle positif

Page 13 : extraction en barrettes, Macherey Nagel

Selon l'ANSES



LSI

Laboratoire Service International

6 Allée des écureuils
Parc d'activité du Bois Dieu
69380 LISSIEU – France

Tel : + (33) 04 72 54 82 82

Fax : + (33) 04 72 54 82 83

Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 17h.
Office open from Monday until Friday : 9 am to 5 pm.

Direction / Management

Eric SELLAL - eric@lsivet.com

Patricia GIROUD – Patricia@lsivet.com

Marketing & commercial / Marketing & commercial Informations commerciales / Commercial Information

Lise Grewis – lise@lsivet.com

Commandes / Orders

Livraisons / Delivery

Richard Giroud – Richard@lsivet.com

Informations PCR / PCR Information

Support Techniques PCR / PCR Technical Information

Stéphanie Colin – stephanie@lsivet.com

Julie Charrot – jcharrot@lsivet.com

Sandrine Moine-Bouley – sandrine@lsivet.com

Stéphane Daly – sdaly@lsivet.com

Informations ELISA / ELISA Information

Support Techniques ELISA / ELISA Technical Information

Laura Fournier – laura@lsivet.com

Informations Légales / Legal Information

LSI – Laboratoire Service International

SAS au capital de 120 000,00 Euros

VAT : FR67380105544

RCS : 38010554400031 APE : 244D

Kit TaqVet™ Swine Influenza A A/H1N1/2009 included

Sommaire

	Pages
I. Mesures de biosécurité	4
II. Introduction	4
III. Réactifs fournis dans le Kit	5
IV. Matériel et réactifs non fournis et conseillés	6
V. Types de prélèvements et traitement	6
VI. Extraction de l'ARN	7
VI-1. Extraction sur colonnes avec le kit QIAGEN RNeasy® Mini Kit	7
VI-2. Extraction sur colonnes avec le kit Macherey Nagel Nucleospin® RNA II	8
VI-3. Extraction en plaque avec le kit Nucleospin 8 RNA	10
VI-4. Extraction en plaque avec le kit Nucleospin 96 RNA	11
VI-5. Extraction avec le kit Nucleospin 8 RNA (système vacuum puis centrifugation)	13
VII. Reconstitution du Mix réactionnel	14
VIII. Protocole d'amplification	14
IX. Interprétation des résultats	15
X. Suite à donner aux analyses	15

Kit TaqVet™ Swine Influenza A A/H1N1/2009 included

Kit pour la détection du virus Influenza A chez le porc par utilisation de sondes

TaqMan® en RT- PCR temps réel

Réf : INFAP-Swine – 100 Tests

I – Mesures de biosécurité

En matière de sécurité microbiologique, les virus grippaux sont classés parmi les pathogènes du groupe 2 (arrêté du 18 juillet 1994 modifié en 1998). Outre les exigences prescrites par la norme ISO 17025, les laboratoires pratiquant la manipulation de ces virus doivent donc être aménagés et doivent fonctionner conformément aux exigences définies dans l'arrêté du 16 juillet 2007 pour les laboratoires manipulant des agents pathogènes classés dans ce groupe.

Cependant, concernant le virus A/H1N1 (2009) pandémique, le principe de précaution a amené les autorités françaises à émettre des recommandations complémentaires pour les manipulations en laboratoires (protection des personnes). Les laboratoires mettant en œuvre **des analyses sur des échantillons biologiques pouvant à priori être contaminés par ce virus A/H1N1 (2009) doivent donc respecter ces recommandations supplémentaires :**

L'extraction de l'ARN viral et le diagnostic virologique par RT-PCR se pratiquent en laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 2 (P2) en adoptant les pratiques et les procédures décrites pour ce type de laboratoire, **auxquels s'ajoutent les mesures suivantes (mesures décrites habituellement en P3) :**

- Port de masque de type FFP2
- Port de lunettes de protection ou de visières de protection
- Port d'une combinaison intégrale de protection jetable
- Port de 2 paires de gants superposées dont la plus superficielle est changée toutes les 20 minutes ou lorsque le manipulateur a fini de travailler sous la hotte à flux laminaire (poste de sécurité microbiologique de type 2 – PSM2)
- Élimination spécifique des déchets à la fin de chaque demi-journée ou journée de travail

A noter que l'isolement et la culture des souches virales s'effectuent en laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3 (P3).

II – Introduction

Le Kit TaqVet™ Swine Influenza A - A/H1N1/2009 included développé par LSI permet la détection d'une séquence du gène M du virus Influenza A, commune à tous les sous-types majeurs de l'influenza A, simultanément à la détection d'un IPC endogène (PCR multiplex). Le kit est spécifique de l'influenza de type A et ne détecte pas l'influenza de type B.

Les primers ont été choisis dans une région très conservée du gène M sur la base d'alignements nucléotidiques de séquences disponibles dans les bases de données publiques. Le Kit TaqVet™ Influenza A permet la détection de **toutes les souches Influenza A porcines (H1N1, H1N2 et H3N2), ainsi que la souche Influenza A/H1N1 (2009) pandémique.**

Le Kit TaqVet™ Swine Influenza A - A/H1N1/2009 included est utilisable sur prélèvements cellulaires (**écouvillon nasal, poumon, tissu trachéal, surnageant de culture cellulaire, liquide allantoïdien ...**)

Chaque échantillon (ARNs obtenus après extraction) est analysé en monocupule :

- La même cupule est utilisée pour la détection spécifique de l'ARN viral du virus Influenza A et pour la détection de l'IPC (Internal Positive Control).
- L'IPC est endogène, il s'agit du gène de la β -actine, présent dans tous les prélèvements porcins.
- La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons.

Le Kit TaqVet™ Swine Influenza A - A/H1N1/2009 included contient :

- un Mix réactionnel prêt à l'emploi (Mix Influenza A) contenant:
 - 1 Set de Nucléotides Influenza A composé de :
 - 1 Forward primer
 - 2 Reverse primers
 - 1 Sonde Influenza A – Sonde TaqMan® marquée FAM - Mgb (indiquer « none » en Quencher).
 - 1 Set de Nucléotides IPC composé de :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IPC – Sonde TaqMan® marquée VIC-TAMRA.
 - 1 Master Mix
 - 1 EPC (External Positive Control) Influenza A **à extraire**.
- L'extraction et la purification de l'ARN viral (à partir de prélèvements cellulaires) sont réalisées sur colonnes : avec **le Kit RNeasy® Mini Kit** (Réf Qiagen 74104 ou 74106) ou le kit **Nucleospin® RNA II** (Réf Macherey Nagel 740955.50 ou 740955.250) ; ou en plaque avec le kit **Nucleospin® 8 RNA** (Réf Macherey Nagel 740698 ou 740698.5) ou le kit **Nucleospin® 96 RNA** (Réf Macherey Nagel 740709.2 ou 740709.4)
 - Le Kit TaqVet™ Swine Influenza A - A/H1N1/2009 included a été validé et doit être utilisé avec un ABIPRISM® 7000, 7300, 7500, avec un ABIPRISM® 7700 ou 7900 HT (Applied Biosystems®), un LightCycler® LC480 (Roche®) un SLAN (LSI™) un Chromo4™ (Bio-Rad®), un MX3005P™ (Stratagene®). Le Kit TaqVet™ Swine Influenza A - A/H1N1/2009 included est utilisable sur d'autres appareils de PCR en temps réel à condition que l'appareil soit validé par LSI. Merci de nous contacter pour connaître la liste des appareils validés.
 - **Les résultats sont interprétés en fonction des Ct (Threshold Cycle) obtenus pour chaque échantillon :**
 - **Si Ct échantillon < 45**, l'échantillon est positif. Pour des échantillons de même nature et analysés simultanément, plus le Ct est faible, plus la charge virale contenue dans l'échantillon est importante.
 - **Si Ct échantillon > 45**, l'échantillon est négatif.

III - Réactifs fournis dans le Kit

Le Kit TaqVet™ Swine Influenza A - A/H1N1/2009 included se présente sous la forme d'un coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 100 tests en monocupule. Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Conservation	Code Couleur
Mix Influenza A	2 Tubes	-20°C	Vert
EPC Influenza A	1 Tube	-20°C	Bleu

Mix Influenza A : Mix réactionnel pour RT-PCR TaqMan associé au pool des primers et sondes Influenza A et IPC.

EPC Influenza A : External Positive Control Influenza. **A extraire**. Ce témoin peut être remplacé par un témoin positif approprié et calibré permettant la validation de l'ensemble du processus analytique (extraction et RT-PCR) à chaque essai.

Attention : Le Contrôle Négatif utilisé dans la réaction n'est pas fourni dans le Kit. LSI recommande d'utiliser de l'eau DNase RNase Free.

2 types de Contrôle Négatif peuvent être utilisés :

1/ NCS : Négative Control Sample : Eau DNase RNase Free extraite comme un échantillon. Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de l'amplification et de l'extraction. **Ce NCS doit obligatoirement être réalisé.**

2/ NC : Negative Control : 25 µl de « Mix Influenza A » dans la plaque d'amplification (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate). Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

IV - Matériel et réactifs non fournis et conseillés

Pour l'amplification :

- Un thermocycleur PCR temps réel avec son consommable : MicroAmp Optical 96-well Reaction Plates et Adhesive Covers.

Pour l'extraction d'ARN à partir d'échantillons liquides :

- Kit d'extraction QIAGEN : RNeasy® mini kit (réf : 74104 ou 74106)
- Kit d'extraction Macherey Nagel : Nucleospin® RNA II (réf : 740955.50 ou 750955.250)
- Kit d'extraction Macherey Nagel : Nucleospin® 8 RNA (réf : 740698 ou 740698.5)
- Kit d'extraction Macherey Nagel : Nucleospin® 96 RNA (réf : 740709.2 ou 740709.4)
- Tubes collecteurs de 2 mL
- β-Mercaptoéthanol 14,3 M
- Ethanol 96-100%
- Eau DNase RNase - free qui servira de **Contrôle Négatif**.

Pour l'extraction d'ARN à partir d'organes :

- Kit d'extraction QIAGEN : RNeasy® mini kit (réf : 74104 ou 74106) + Qiasredder spin column QIAGEN (réf. : 79656).
- Kit d'extraction Macherey Nagel : Nucleospin® RNA II (réf : 740955.50 ou 750955.250)
- Kit d'extraction Macherey Nagel : Nucleospin® 8 RNA (réf : 740698 ou 740698.5) + NucleoSpin® RNA Filter Strips (réf : 740699.12F ou 740699.60F)
- Kit d'extraction Macherey Nagel : Nucleospin® 96 RNA (réf : 740709.2 ou 740709.4) + NucleoSpin RNA® Filter Plate (réf : 740711)
- Tubes collecteurs de 2 mL
- β-Mercaptoéthanol 14,3 M
- Ethanol 96-100%
- Eau DNase RNase - free qui servira de **Contrôle Négatif**.
- Pour le broyage mécanique : un broyeur de type Tissue Lyser (Réf Qiagen : 85220) + Tissue Lyser adaptater set 2x24 (réf Qiagen : 69982) ou Tissue Lyser adaptater set 2x96 (Réf Qiagen : 69984).

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués

V - Types de prélèvements et traitement

Échantillons liquides (surnageant de culture, liquide allantoïdien, liquide broncho-alvéolaire)

L'extraction peut être réalisée directement sur ce type d'échantillons en se référant au **protocole d'extraction « Échantillons liquides » correspondant au kit d'extraction utilisé.**

Écouvillons nasaux

- Types d'écouvillons utilisables :

1/ Écouvillons dédiés à la recherche virale

Il est recommandé d'utiliser des écouvillons conçus pour le transport et la conservation des virus.

Ex : Écouvillons Virocult MW950 (Kitvia) : une éponge imbibée de milieu de transport est présente au fond du tube de l'écouvillon. Quand celui-ci a été utilisé et est replacé dans le tube, il entre en contact avec l'éponge et s'imbibe du liquide de transport.

Après prélèvements, il est recommandé de transmettre les écouvillons le plus rapidement possible au laboratoire d'analyses, mais ils peuvent être conservés à température ambiante pendant 24 h ou à 4°C pendant 72 h si besoin.

2/ Écouvillons « secs »

Il est possible d'utiliser des écouvillons dits « secs », mais dans ce cas, les prélèvements doivent être transmis au laboratoire dans les 4 h (afin de préserver l'intégrité et la survie du virus s'il est présent).

- Traitement des écouvillons au laboratoire en vue d'un diagnostic par PCR et d'un isolement viral

Valable quelque soit le type d'écouvillon utilisé.

1. Déposer sur l'écouvillon placé dans son tube de transport, 2 ml de milieu MEM contenant 100 IU/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.
Remarque : A défaut de MEM + PS, déposer 2 ml d'eau physiologique.
2. Masser l'écouvillon à travers le tube de transport et vortexer quelques secondes.
3. Prélever **200 µl** pour l'extraction des ARN viraux.
4. Prélever le reste du volume disponible (jusqu'à 1,8ml), le déposer dans un tube de stockage adéquat et stocker à -80°C (en vue de l'isolement viral).

L'extraction sera réalisée sur les 200 µl de surnageant prélevés, en se référant au **protocole d'extraction « Échantillons liquides » correspondant au kit d'extraction utilisé.**

Organes

Après le prélèvement d'un organe, il existe 2 traitements :

- 1/ L'organe est prélevé à proximité du laboratoire PCR (Salle d'autopsie par exemple), il est conseillé de découper des petits morceaux d'organe frais de 30 mg. Deux procédures sont ensuite possibles :
 - soit réaliser l'extraction de l'ARN immédiatement.
 - soit congeler les morceaux découpés à -20°C.
- 2/ L'organe est prélevé à distance du laboratoire réalisant les analyses PCR, il est conseillé :
 - soit de faire voyager l'organe à +4°C (Transport < 24 heures).
 - soit de congeler l'organe (Transport > 24 Heures). Les morceaux de 30 mg seront préparés à partir de l'organe décongelé.

L'extraction sera réalisée sur ces morceaux d'organe de 20 à 30 mg en se référant au **protocole d'extraction « Organes » correspondant au kit d'extraction utilisé.**

VI - Extraction de l'ARN

VI-1 – Extraction sur colonnes avec le kit QIAGEN RNeasy® Mini kit, Réf : 74104 ou 74106

Composition du Kit RNeasy® Mini kit, Réf : 74104 ou 74106

- RNeasy Mini spin columns
- Collection Tubes (1,5 ml)
- Collection Tubes (2 ml)
- Buffer RLT ⁽¹⁾
- Buffer RW1 ⁽²⁾
- Buffer RPE ⁽³⁾
- DNase RNase – Free Water

⁽¹⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel. Ajouter **10 µl** de β-Mercaptoéthanol (β-ME) pour 1 ml de « Buffer RLT ». La solution ainsi préparée, « Solution RLT+β-ME » est stable 1 mois à température ambiante et à l'obscurité.

⁽²⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

⁽³⁾ : Fourni sous forme concentrée. Avant la première utilisation, ajouter l'éthanol (96-100%) comme indiquée sur le flacon.

- L'extraction de l'EPC est à réaliser en même temps que celles des échantillons.

Il est possible de conserver les ARN extraits des EPC : 1 mois à -20°C ou 6 mois à -70/-80°C. Dans tous les cas, il est conseillé d'aliqoter les ARN des EPC extraits afin d'éviter des cycles de congélation/décongélation.

- L'extraction du NCS (Contrôle Négatif « sample ») sera réalisée dans les conditions ci-dessous en remplaçant l'échantillon par de l'eau DNase RNase Free.

a. Échantillons liquides (éluât d'écouvillon, surnageant de culture, liquide allantoidien ...)

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RLT » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

1. Ajouter **10 µL** de β-ME à **14,3M** pour 1 ml de « Buffer RLT ».
2. Mettre **350 µL** de Solution « RLT+β-ME » dans un microtube de 2 ml.
3. Ajouter **200 µL** d'échantillon (ou d'EPC) – Vortexer.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions RNeasy® » (p8)**

b. Organes

▪ **Le β -Mercaptoéthanol (β -ME) doit être ajouté au « Buffer RLT » avant utilisation. Le β -ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

- Protocole avec broyage mécanique

1. Ajouter **10 μ L** de **β -ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RLT ».
2. Dans un microtube de 2 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
3. Ajouter dans le microtube **350 μ L** de la **Solution « RLT+ β -ME »** et **1 bille – Broyer** 2 min à 30Hz.
4. Passer sur une colonne **QIAshredder (colonne violette)** – centrifuger 2 min à 14000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions RNeasy® » (p8)**

- Protocole sans broyage mécanique

1. Ajouter **10 μ L** de **β -ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RLT ».
2. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
3. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
4. Ajouter dans le microtube **350 μ L** de la **Solution « RLT+ β -ME »** – vortexer pendant au moins 5 minutes.
5. Passer sur une colonne **QIAshredder (colonne violette)** – centrifuger 2 min à 14000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions RNeasy® » (p8)**

Suite des extractions RNeasy® :

6. Ajouter **350 μ L d'éthanol à 70%** dans le tube collecteur ou le microtube - homogénéiser à l'aide d'une pipette.
7. Prendre les mini-colonnes du kit RNeasy® (colonnes roses) (**identifier la colonne**)
8. A l'aide d'une pipette, transférer **700 μ L d'échantillon** sur la colonne – boucher – centrifuger 1 min à 8000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
9. Distribuer **700 μ L** de **Buffer RW1** dans chaque colonne – boucher – centrifuger 1 min à 8000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
10. Distribuer **500 μ L** de **Buffer RPE** (contenant de l'éthanol) dans chaque colonne – boucher – centrifuger 1 min à 8000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
11. Distribuer **500 μ L** de **Buffer RPE** (contenant l'éthanol) dans chaque colonne – boucher – centrifuger 1 min à 8000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
12. Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur – centrifuger 3 min à 14000g (pour sécher la membrane).
13. Placer la colonne dans un Microtube de 1,5 mL (DNase RNase et DNase free) – distribuer **50 μ L d'eau DNase RNase free** – boucher – **incuber 2 min** à température ambiante – centrifuger 1 min à 8000g pour éluer – **jeter la colonne** – boucher et identifier le Microtube.

Stocker le microtube dans de la glace (ou entre +2°C et +8°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ARN à -20°C ou -70°C. (*Éviter de faire plus de 3 cycles de congélation-décongélation*).

[VI-2 – Extraction sur colonnes avec le kit Macherey Nagel Nucleospin® RNA II, Réf : 740955.50 ou 740955.250](#)

Composition du Kit Nucleospin® RNA II, Réf : 740955.50 ou 740955.250

- Filtre : NucleoSpin® Filter
- Colonnes : NucleoSpin® RNA II
- Collection Tubes (2 ml)
- Collection Tubes (1,5 ml)
- Buffer RA1 ^{(1) (2)}
- Buffer RA2 ⁽¹⁾

- Buffer RA3⁽³⁾
- Buffer MDB⁽¹⁾
- rDNase , Rnase-Free
- Reaction buffer for rDNase
- RNase Free Water

⁽¹⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

⁽²⁾ : Ajouter **10 µl** de β-Mercaptoéthanol (β-ME) pour 1 ml de « Buffer RA1 ». La solution ainsi préparée, « Solution RA1+β-ME » est stable 1 mois à température ambiante et à l'obscurité.

⁽³⁾ : Fourni sous forme concentrée. Avant la première utilisation, ajouter l'éthanol (96-100%) comme indiquée sur le flacon.

- L'extraction de l'EPC est à réaliser en même temps que celles des échantillons.

Il est possible de conserver les ARN extraits des EPC : 1 mois à -20°C ou 6 mois à -70/-80°C. Dans tous les cas, il est conseillé d'aliqoter les ARN des EPC extraits afin d'éviter des cycles de congélation/décongélation.

- L'extraction du NCS (Contrôle Négatif « sample ») sera réalisée dans les conditions ci-dessous en remplaçant l'échantillon par de l'eau DNase RNase Free.

a. Échantillons liquides (éluât d'écouvillon, surnageant de culture, liquide allantoidien ...)

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RA1 » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Mettre **350 µL** de **Solution « RA1+β-ME »** dans un microtube de 2 ml.
3. Ajouter **200 µL** d'échantillon (ou d'EPC) – Vortexer.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® RNA II » (p9)**

b. Organes

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RA1 » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

- Protocole avec broyage mécanique

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Dans un microtube de 2 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
3. Ajouter dans le microtube **350 µL** de la **Solution « RA1+β-ME »** et **1 bille** – **Broyer** 2 min à 30Hz.
4. Passer sur une colonne **NucleoSpin® Filter (colonne violette)** – centrifuger 1 min à 11000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® RNA II » (p9)**

- Protocole sans broyage mécanique

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
3. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
4. Ajouter dans le microtube **350 µL** de la **Solution « RA1+β-ME »** – Vortexer pendant au moins 5 minutes.
5. Passer sur une colonne **NucleoSpin® Filter (colonne violette)** – centrifuger 1 min à 11000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® RNA II » (p9)**

Suite des extractions Nucleospin® RNA II :

6. Ajouter **350 µL d'éthanol à 70%** dans le tube collecteur ou le microtube - homogénéiser à l'aide d'une pipette.
7. Prendre les mini-colonnes du kit Nucleospin® RNA II (colonnes bleues) (**identifier la colonne**)

8. A l'aide d'une pipette, transférer **700 µL d'échantillon** sur la colonne – boucher – centrifuger 30 secondes à 11000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
9. Distribuer **200 µL** de **Buffer RA2** dans chaque colonne – boucher – centrifuger 30 sec à 11000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
10. Distribuer **600 µL** de **Buffer RA3** (contenant l'éthanol) dans chaque colonne – boucher – centrifuger 30 sec à 11000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
11. Distribuer **250 µL** de **Buffer RA3** (contenant l'éthanol) dans chaque colonne – boucher – centrifuger 30 sec à 11000g – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne.**
14. Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml - centrifuger 2 min à 11000g (pour sécher la membrane).
12. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 mL (DNase RNase et DNase free) – distribuer **60 µL d'eau DNase RNase free** – boucher – **incuber 2 min** à température ambiante – centrifuger 1 min à 11000g pour éluer – **jeter la colonne** – boucher et identifier le microtube.

Stocker le microtube dans de la glace (ou entre +2°C et +8°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ARN à -20°C ou -70°C. (*Éviter de faire plus de 3 cycles de congélation-décongélation*).

VI-3 – Extraction en plaque avec le kit Macherey Nagel Nucleospin® 8 RNA, Réf : 740698 ou 740698.5

Composition du Kit Nucleospin® 8 RNA, Réf : 740698 ou 740698.5

- NucleoSpin® RNA Binding Strip
- Bloc MN Square-well
- Portoir de tubes avec capuchon
- Collection Tubes (1,5 ml)
- Buffer RA1 ⁽¹⁾⁽²⁾
- Buffer RA2 ⁽¹⁾
- Buffer RA3 ⁽³⁾
- Buffer RA4 ⁽³⁾
- rDNase , Rnase-Free
- Reaction buffer for rDNase
- RNase Free Water

⁽¹⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

⁽²⁾ : Ajouter **10 µl** de β-Mercaptoéthanol (β-ME) pour 1 ml de « Buffer RA1 ». La solution ainsi préparée, « Solution RA1+β-ME » est stable 1 mois à température ambiante et à l'obscurité.

⁽³⁾ : Fourni sous forme concentrée. Avant la première utilisation, ajouter l'éthanol (96-100%) comme indiquée sur le flacon.

- L'extraction de l'EPC est à réaliser en même temps que celles des échantillons.

Il est possible de conserver les ARN extraits des EPC : 1 mois à -20°C ou 6 mois à -70/-80°C. Dans tous les cas, il est conseillé d'aliqoter les ARN des EPC extraits afin d'éviter des cycles de congélation/décongélation.

- L'extraction du NCS (Contrôle Négatif « sample ») sera réalisée dans les conditions ci-dessous en remplaçant l'échantillon par de l'eau DNase RNase Free.

a. Échantillons liquides (éluât d'écouvillon, surnageant de culture, liquide allantoidien ...)

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RA1 » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Mettre **300 µL** de **Solution « RA1+β-ME »** dans un microtube de 2 ml.
3. Ajouter **200 µL** d'échantillon (ou d'EPC) – Vortexer.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® 8 RNA » (p11)**

b. Organes

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RA1 » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

- **Protocole avec broyage mécanique**

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».

2. Dans un microtube de 2 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
3. Ajouter dans le microtube **300 µL** de la **Solution « RA1+β-ME »** et **1 bille** – **broyer** 2 min à 30Hz.
4. Passer le lysat sur une barrette de filtration **NucleoSpin® RNA Filter Strips** – centrifuger 1 min à 6000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® 8 RNA» (p11)**

- **Protocole sans broyage mécanique**

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
3. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
4. Ajouter dans le microtube **300 µL** de la **Solution « RA1+β-ME »** – vortexer pendant au moins 5 minutes.
5. Passer le lysat sur une barrette de filtration **NucleoSpin® RNA Filter Strips** – centrifuger 1 min à 6000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® 8 RNA» (p11)**

Suite des extractions Nucleospin® 8 RNA :

6. Ajouter **300 µL** de **tampon RA4** (contenant l'éthanol) dans le tube collecteur ou le microtube - homogénéiser à l'aide d'une pipette
7. Prendre les barrettes de binding du kit Nucleospin® 8 RNA et les placer sur un Bloc MN Square-well (**créer un plan de plaque**)
8. A l'aide d'une pipette, transférer **700 µL d'échantillon** dans les puits de la barrette – centrifuger 2 min à 6000g – décaler les barrettes sur des puits non utilisés du Bloc MN Square-well (ou changer de bloc).
9. Distribuer **500 µL** de **Buffer RA3** (contenant l'éthanol) dans chaque puits de la barrette – centrifuger 2 min à 6000g – décaler les barrettes sur des puits non utilisés du Bloc MN Square-well (ou changer de bloc).
10. Distribuer **500 µL** de **Buffer RA2** dans chaque puits de la barrette – centrifuger 2 min à 6000g – décaler les barrettes sur des puits non utilisés du Bloc MN Square-well (ou changer de bloc).
11. Distribuer **800 µL** de **Buffer RA3** (contenant l'éthanol) dans chaque puits de la barrette – centrifuger 2 min à 6000g – décaler les barrettes sur des puits non utilisés du Bloc MN Square-well (ou changer de bloc).
12. Distribuer **500 µL** de **Buffer RA4** (contenant l'éthanol) dans chaque puits de la barrette – centrifuger 10 min à 6000g.
13. Placer la barrette sur les barrettes d'éluition dans leur portoir – distribuer **75 µL d'eau DNase RNase free** – **incuber 2 min** à température ambiante – centrifuger 3 min à 6000g pour éluer – **jeter la barrette de binding** – boucher et identifier la barrette d'éluition.

Stocker le microtube dans de la glace (ou entre +2°C et +8°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ARN à - 20°C ou - 70°C. (*Éviter de faire plus de 3 cycles de congélation-décongélation*).

VI-4 – Extraction en plaque avec le kit Macherey Nagel Nucleospin® 96 RNA, Réf : 740709.2 ou 740709.4

Composition du Kit Nucleospin® 96 RNA, Réf : 740709.2 ou 740709.4

- Plaques : NucleoSpin® RNA Binding Plate
- Bloc MN Square-well
- Plaque d'éluition
- Collection Tubes (1,5 ml)
- Buffer RA1 ⁽¹⁾⁽²⁾
- Buffer RA2 ⁽¹⁾
- Buffer RA3 ⁽³⁾
- Buffer RA4 ⁽³⁾
- rDNase , Rnase-Free
- Reaction buffer for rDNase
- RNase Free Water

⁽¹⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

⁽²⁾ : Ajouter **10 µl** de β-Mercaptoéthanol (β-ME) pour 1 ml de « Buffer RA1 ». La solution ainsi préparée, « Solution RA1+β-ME » est stable 1 mois à température ambiante et à l'obscurité.

⁽³⁾ : Fourni sous forme concentrée. Avant la première utilisation, ajouter l'éthanol (96-100%) comme indiquée sur le flacon.

- L'extraction de l'EPC est à réaliser en même temps que celles des échantillons.

Il est possible de conserver les ARN extraits des EPC : 1 mois à -20°C ou 6 mois à -70/-80°C. Dans tous les cas, il est conseillé d'aliqoter les ARN des EPC extraits afin d'éviter des cycles de congélation/décongélation.

- L'extraction du NCS (Contrôle Négatif « sample ») sera réalisée dans les conditions ci-dessous en remplaçant l'échantillon par de l'eau DNase RNase Free.

a. Échantillons liquides (éluât d'écouvillon, surnageant de culture, liquide allantoidien ...)

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RA1 » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Mettre **300 µL** de **Solution « RA1+β-ME »** dans un microtube de 2 ml.
3. Ajouter **200 µL** d'échantillon (ou d'EPC) – vortexer.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® 96 RNA » (p12)**

b. Organes

▪ **Le β-Mercaptoéthanol (β-ME) doit être ajouté au « Buffer RA1 » avant utilisation. Le β-ME est toxique. A utiliser sous une hotte à flux laminaire et avec une tenue de protection : gants, masque, blouse,...**

Protocole avec broyage mécanique

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Dans un microtube de 2 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
3. Ajouter dans le microtube **300 µL** de la **Solution « RA1+β-ME »** et **1 bille** – broyer 2 min à 30Hz.
4. Passer le lysat sur une plaque de filtration **NucleoSpin® RNA Filter Plate** – centrifuger 1 min à 6000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® 96 RNA » (p12)**

Protocole sans broyage mécanique

1. Ajouter **10 µL** de **β-ME à 14,3M** pour 1 ml de « Buffer RA1 ».
2. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
3. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 à 30 mg** de l'organe préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
4. Ajouter dans le microtube **300 µL** de la **Solution « RA1+β-ME »** – vortexer pendant au moins 5 minutes.
5. Passer le lysat sur une plaque de filtration **NucleoSpin® RNA Filter Plate** – centrifuger 1 min à 6000g et conserver l'éluât.

➤ **Continuer l'extraction à l'étape 6 du paragraphe « Suite des extractions Nucleospin® 96 RNA » (p12)**

Suite des extractions Nucleospin® 96 RNA :

6. Ajouter **300 µL** de **tampon RA4** (contenant l'éthanol) dans le tube collecteur ou le microtube - homogénéiser à l'aide d'une pipette.
7. Prendre une plaque de binding du kit Nucleospin® 96 RNA et la placer sur un Bloc MN Square-well (**créer un plan de plaque**)

8. A l'aide d'une pipette, transférer **700 µL d'échantillon** dans les puits de la plaque de binding – centrifuger 2 min à 6000g – transférer la plaque sur un Bloc MN Square-well non utilisé.
9. Distribuer **500 µL** de **Buffer RA3** (contenant l'éthanol) dans chaque puits de la plaque de binding – centrifuger 2 min à 6000g – transférer la plaque sur un Bloc MN Square-well non utilisé.
10. Distribuer **500 µL** de **Buffer RA2** dans chaque puits de la plaque de binding – centrifuger 2 min à 6000g – transférer la plaque sur un Bloc MN Square-well non utilisé.
11. Distribuer **800 µL** de **Buffer RA3** (contenant l'éthanol) dans chaque puits de plaque de binding – centrifuger 2 min à 6000g – transférer la plaque sur un Bloc MN Square-well non utilisé.
12. Distribuer **500 µL** de **Buffer RA4** (contenant l'éthanol) dans chaque puits de la plaque de binding – centrifuger 10 min à 6000g
13. Placer la plaque sur la plaque d'élution – distribuer **75 µL d'eau DNase RNase free** – **incuber 2 min** à température ambiante – centrifuger 3 min à 6000g pour éluer – **jeter la plaque de binding** – boucher et identifier la plaque d'élution.

Stocker le microtube dans de la glace (ou entre +2°C et +8°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ARN à -20°C ou -70°C. (*Éviter de faire plus de 3 cycles de congélation-décongélation*)

VI-5 – Extraction avec le kit Macherey Nagel Nucleospin® 8 RNA (système vacuum puis centrifugation)

Le système vacuum est composé d'une chambre à vide munie d'un récipient à caler grâce à 2 adaptateurs, d'une plaque de 96 puits en forme d'entonnoir à usage unique (MN Wash Plate) à déposer sur le récipient. Les colonnes en barrettes sont déposées sur un support métallique (Column Holder C) à placer sur la chambre à vide.

Si l'extraction comporte moins de 6 barrettes, il est nécessaire de compléter le système par des barrettes spéciales avec colonnes en caoutchouc pour appliquer un vide efficace.

La chambre à vide est reliée à une pompe électrique par un tuyau avec un robinet qui reste en position fermée pour protéger les échantillons de toute contamination. Le vide est appliqué en allumant la pompe à vide via un interrupteur, en réglant ensuite le vide grâce à la molette du manomètre, et enfin en ouvrant le robinet pour faire passer la pression. Quand le liquide est passé au travers de la membrane, le robinet est à fermer avant d'éteindre la pompe. Pour évacuer la pression, il faut ouvrir le robinet puis le refermer.

Échantillons liquides (éluât d'écouvillon, surnageant de culture, liquide allantoidien ...)

1. Déposer **200 µL** d'échantillon puis **300 µL** de tampon **RA1** supplémenté en β-Mercaptoéthanol à 10 µL/ml dans une plaque MN Square Well Block. Mélanger par flux et reflux à la pipette.
2. Ajouter **300 µL** de tampon **RA4** préalablement supplémenté en éthanol 100%. Mélanger par flux et reflux à la pipette 10 fois minimum.
3. Déposer **700 µL de mélange sur les barrettes de colonnes** (bleues) conformément au plan de plaque établi et appliquer un vide faible (50mbar) pour obtenir un passage de l'échantillon au goutte à goutte.
4. Ajouter **500 µL** de **RA2**. Appliquer 200 à 400 mbar de vide pendant le temps du passage de l'échantillon (environ 1min).
5. Ajouter **800 µL** de **RA3**. Appliquer 200 à 400 mbar de vide pendant le temps du passage de l'échantillon (environ 1min).
6. Ajouter **500 µL** de **RA4**. Appliquer 200 à 400 mbar de vide pendant le temps du passage de l'échantillon (environ 1min).
7. Placer les barrettes de colonnes fixées sur le portoir métallique Column Holder C sur une plaque MN Square Well Block (en les séparant en 2 pour équilibrer les nacelles de la centrifugeuse) et effectuer le séchage des colonnes par centrifugation à 6000 g pendant 10 min.
8. Transférer les barrettes de colonnes sur les barrettes de tubes prévues pour l'élution (barrettes de 8 puits « Rack with Tube Strips » ou plaque 96 puits « Round Well Block Low »). Ajouter **75 µL d'eau Rnase free**. Incuber 2 min à température ambiante. Centrifuger 3 min à 6000 g.
9. Boucher les tubes ou puits, identifier et conserver les extraits d'ARN à -20°C, -70°C ou sur la glace si utilisation immédiate.

VII - Reconstitution des Mix réactionnels

Les mix de RT-PCR temps réel sont prêts à l'emploi, ils ne nécessitent donc aucune reconstitution avant l'ajout de l'extrait d'ARN à tester.

Ne jamais mélanger de réactifs issus de Kits TaqVet™ ayant des numéros de lots différents.

VIII - Protocole d'amplification

Exemple d'utilisation avec un thermocycleur ABI Prism

1. Prendre une plaque MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate + Adhesive Cover et créer le plan de plaque (Logiciel Abiprism SDS):
 - a. Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :

Influenza A : Reporter FAM, Quencher : NONE (car sonde Mgb, c'est-à-dire avec un Quencher non fluorescent)
 IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA
 - b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » Influenza A et le « Detector » IPC.
 - c. Exemple de plan de plaque à réaliser.

	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A	Mix Influenza A
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC Influenza A	Éch6	Éch14	Éch22	Éch30	Éch38	Éch46	Éch54	Éch62	Éch70	Éch78	Éch86
B	NCS	Éch7	Éch15	Éch23	Éch31	Éch39	Éch47	Éch55	Éch63	Éch71	Éch79	Éch87
C	NC	Éch8	Éch16	Éch24	Éch32	Éch40	Éch48	Éch56	Éch64	Éch72	Éch80	Éch88
D	Éch1	Éch9	Éch17	Éch25	Éch33	Éch41	Éch49	Éch57	Éch65	Éch73	Éch81	Éch89
E	Éch2	Éch10	Éch18	Éch26	Éch34	Éch42	Éch50	Éch58	Éch66	Éch74	Éch82	Éch90
F	Éch3	Éch11	Éch19	Éch27	Éch35	Éch43	Éch51	Éch59	Éch67	Éch75	Éch83	Éch91
G	Éch4	Éch12	Éch20	Éch28	Éch36	Éch44	Éch52	Éch60	Éch68	Éch76	Éch84	Éch92
H	Éch5	Éch13	Éch21	Éch29	Éch37	Éch45	Éch53	Éch61	Éch69	Éch77	Éch85	Éch93

2. Agiter les tubes de « Mix Influenza A » puis centrifuger rapidement avant ouverture. Ne pas oublier que la réaction est réalisée en monocupule.
3. Déposer **20 µL de « Mix Influenza A »** dans toutes les cupules de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.
4. Déposer **5 µL d'échantillon** (ARN extrait) dans toutes les cupules de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.
5. Couvrir la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate avec un Adhesive Cover et la placer dans le thermocycleur. Lancer l'amplification selon le programme suivant :

Etape 1 : 45°C – 10 minutes – Répétition : 1

Etape 2 : 95°C – 10 minutes – Répétition : 1

Etape 3 : 95°C – 15 secondes puis 60°C – 45 secondes – Répétitions : 45
6. Lire les résultats après avoir lancé l'application « Analyse ». Nous sommes à votre disposition pour examiner vos résultats : envoyer votre plaque (fichier SDS) par e-mail à contact@lsivet.com

IX - Interprétation des Résultats

Utiliser le logiciel ABIPRISM SDS Software

Passer sur le module « Amplification Plot » après avoir établi une ligne de base cohérente.

Validation du test

Contrôler que l'EPC (Mix Influenza) est positif :

■ Ct EPC Influenza A / « Detector » Influenza A < 45.

NB : Ce témoin peut être remplacé par un témoin positif approprié et calibré permettant la validation de l'ensemble du processus analytique (extraction et RT-PCR) à chaque essai.

Contrôler les Contrôles Négatifs :

■ Ct NCS / « Detector » IPC > 45.
 ■ Ct NCS / « Detector » Influenza A > 45.
 ■ Ct NC / « Detector » IPC > 45.
 ■ Ct NC / « Detector » Influenza A > 45.

Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » INFLUENZA A	« Detector » IPC
Positif Influenza A	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif Influenza A	Ct > 45	Ct < 45
Non validé (*)	Ct > 45	Ct > 45

(*): l'échantillon sera rendu comme **non validé** en raison de la négativité de l'IPC.

Conduite à tenir pour les échantillons non validés :

- Diluer au 1/10 l'ARN extrait de l'échantillon non validé (5 µl ARN « non validé » dans 45 µl d'eau DNase RNase free).
- Faire une nouvelle analyse PCR sur 5 µl de l'ARN « non validé » dilué.
- Si l'ARN « non validé » dilué est positif ou est négatif avec un résultat IPC positif (Ct Detector IPC <45), le résultat obtenu est alors validé.
- Si l'ARN « non validé » dilué est négatif avec un résultat IPC négatif (Ct Detector IPC > 45), le résultat obtenu est toujours non validé. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon « non validé » en le pré-diluant au 1/10 dans de l'eau DNase RNase free avant extraction.

X - Suite à donner aux analyses

Les échantillons positifs doivent être analysés au regard du virus A/H1N1 (2009) pandémique.