


VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit

PCR temps réel TaqMan® pour la détection du virus de la Peste Porcine Africaine

Référence catalogue A28809

N° de document 100027917 Pub. n° MAN0019541 Rév. A.0

Technique	Espèces	Échantillons	Type de test
PCR temps réel (ADN) • Essais en duplex • IPC exogène	Porcins	Sang	Individuel ou en mélange (5 ou 10 échantillons)
		Sérum	
		Tissus	Individuel

 **AVERTISSEMENT !** Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de protection, des gants et des vêtements appropriés. Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse thermofisher.com/support.

Description du produit

Le Applied Biosystems™ VetMAX™ African Swine Fever Virus Detection Kit (N° Cat. A28809) permet de détecter le virus de la peste porcine africaine (PPA) dans le sang, le sérum ou les tissus porcins par amplification PCR temps réel du gène P72 de la PPA.

L'analyse est une PCR temps réel monopuits dans laquelle les cibles PPA et le contrôle positif interne (IPC) exogène sont amplifiés et détectés à l'aide de sondes fluorescentes TaqMan®.

Le kit comprend :

- 3 - Mix ASFV : contient des amorces, des sondes TaqMan®, un tampon et une enzyme pour une amplification optimisée en duplex par PCR temps réel des cibles PPA et IPC.
- 4a - EPC ASFV : matrice d'acide nucléique pour amplification de cible P72. Elle sert de contrôle positif externe pour la réaction PCR temps réel et est utilisée pour définir le cycle seuil (C_T) afin d'évaluer les résultats des tests.
- 5 - IPC ASFV : contrôle positif interne ajouté à chaque échantillon et contrôle lors de l'étape de lyse de la procédure d'extraction de l'ADN. Il sert de contrôle pour le processus de purification de l'ADN et permet de surveiller la présence d'inhibiteurs de la PCR.

Contenu et conservation

Composant	Quantité ^[1]	Conservation ^[2]
3 - Mix ASFV	2 × 1000 µl	-30°C à -10°C
4a - EPC ASFV	2 × 90 µl	
5 - IPC ASFV	1 × 500 µl	

^[1] Suffisant pour 100 réactions PCR temps réel de 25 µl.

^[2] Se référer à l'emballage pour la date de péremption.

Matériels requis non fournis

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur thermofisher.com. PFL (Principal fournisseur de laboratoire) : Fisher Scientific (fisherscientific.com) ou l'un des principaux fournisseurs de matériel de laboratoire.

Élément	Source
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System	Contactez votre représentant commercial local.
Plaques à 96 puits, tubes de barrettes (à 8 ou 12 puits), microtubes ou capillaires compatibles avec le thermocycleur utilisé	PFL
Pipettes sans nucléase et embouts de pipettes à filtre	PFL
Deux bacs de glace ou portoirs réfrigérants : • Un pour la zone de configuration de la PCR dans laquelle le master mix PCR est préparé • Un pour la zone dans laquelle les échantillons d'ADN et les contrôles sont préparés	PFL
Couvercles pour plaques ou bouchons compatibles avec les plaques, les tubes de barrettes, les microtubes ou les capillaires	PFL
Tubes de réactifs sans nucléase pour préparer le master mix	PFL
Eau nuclease-free (non traitée au DEPC)	AM9939
1X TE Buffer	PFL

Instructions

- Pour chaque test de PCR temps réel, inclure les contrôles indiqués à l'étape "Préparer les réactions de PCR" en page 2.
- Respecter les "Bonnes pratiques de laboratoire pour la PCR et la RT-PCR" en page 4 pour éviter les faux positifs et la contamination des échantillons testés par des produits de PCR.

Exigences concernant l'ADN

Nous recommandons l'utilisation du MagMAX™ Pathogen RNA/DNA Kit (N° Cat. 4462359) pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons biologiques, mais vous pouvez également utiliser d'autres méthodes d'extraction d'ADN de haute qualité après validation appropriée dans votre laboratoire. De plus, préparer un échantillon témoin purifié avec de l'eau sans nucléase comme matériel de départ. Utiliser la même méthode d'isolement d'ADN que pour les échantillons testés.

IMPORTANT ! Ajouter 5 µl de 5 - IPC ASFV à la solution de lyse utilisée pour l'isolement d'ADN pour chaque échantillon et contrôle d'extraction.

Avant de commencer

1. Décongeler les réactifs et échantillons :
 - a. Décongeler 3 – Mix ASFV dans un bac de glace ou un portoir réfrigérant.
 - b. Décongeler 4a – EPC ASFV, 5 – IPC ASFV et les échantillons d'ADN dans un bac de glace ou un portoir réfrigérant différent.
2. Homogénéiser le contenu de chaque tube en le vortexant, puis centrifuger brièvement.

Stocker les réactifs, les contrôles et les échantillons décongelés à 2 – 8°C jusqu'à utilisation.

Préparer les réactions de PCR

1. Répartir 20 µl de 3 – Mix ASFV dans le nombre approprié de puits de plaques PCR, de barrettes PCR ou de capillaires utilisés.
2. Ajouter l'échantillon ou le contrôle conformément au tableau suivant :

Type d'échantillon	Composant	Volume par réaction
Échantillon testé	Échantillon d'ADN	5,0 µl
Contrôle positif	4a – EPC ASFV	5,0 µl
Contrôle d'extraction	Échantillon témoin purifié	5,0 µl
Contrôle sans acide nucléique (NTC)	Eau nuclease-free	5,0 µl

3. Sceller chaque plaque ou tube, mélanger, puis centrifuger brièvement pour amener le contenu au fond des puits de plaque ou des tubes.

Configurer et démarrer l'instrument PCR temps réel

1. En suivant les instructions du fabricant, configurer le test de PCR temps réel à l'aide des paramètres suivants.
 - Volume réactionnel : 25 µl
 - Référence passive : fluorophore ROX™ (inclus dans 3 – Mix ASFV)

Remarque : le fluorophore ROX™ est à renseigner obligatoirement si l'instrument est capable de le détecter. Les instruments de PCR temps réel qui ne détectent pas le fluorophore ROX™ peuvent être utilisés sans affecter l'exactitude de la lecture.

 - Sélectionner des détecteurs et attribuer des reporters de sondes TaqMan® et des quenchers pour chaque puits, tube ou capillaire utilisé pour l'analyse.

Cible	Reporter	Quencher
PPA	Fluorophore FAM™	Quencher non fluorescent (NFQ)
IPC	Fluorophore VIC™	Fluorophore TAMRA™ ^[1]

^[1] Le fluorophore TAMRA™ est à renseigner obligatoirement pour l'analyse PCR temps réel si l'instrument est capable de le détecter. Les instruments de PCR temps réel qui ne détectent pas le fluorophore TAMRA™ peuvent être utilisés sans affecter l'exactitude de la lecture.

- Programme du thermocycleur :

Étape	Répétitions	Température	Durée
1	1	50°C	2 minutes
2	1	95°C	10 minutes
3	45	95°C	15 secondes
		60°C	1 minute

2. Démarrer le programme de thermocycleur et récupérer les données d'amplification en temps réel au cours de l'étape 3.

Consignes pour l'analyse des données

- Suivre le guide de l'utilisateur de l'instrument pour l'analyse des données brutes.
- Fixer les seuils pour chaque cible séparément.
- Interpréter les résultats de chaque contrôle et échantillon en fonction des valeurs C_t obtenues comme indiqué dans les sections suivantes.

Critères de validation

Se référer aux valeurs C_{tQC} dans le certificat d'analyse du lot de fabrication du kit. Le test est validé si les critères suivants sont respectés :

Type de réaction	Cible PPA (fluorophore FAM™)	Cible IPC (fluorophore VIC™)	Interprétation
Contrôle positif	$C_t = C_{tQC} PPA \pm 3 C_t^{[1]}$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45^{[2]}$	La PCR est validée.
Contrôle d'extraction ^[3]	$C_t > 45$	$C_t = C_{tQC} IPC \pm 3 C_t^{[4]}$	L'extraction de l'ADN est validée.
Contrôle sans acide nucléique (NTC)	$C_t > 45$	$C_t > 45$	Les réactifs PCR sont validés.

^[1] Voir le tableau EPC dans le certificat d'analyse.

^[2] La valeur d'IPC de la réaction du contrôle positif n'est pas à prendre en compte pour la validation du test.

^[3] Utiliser le contrôle d'extraction préparé avec la même procédure d'extraction que celle utilisée pour les échantillons.

^[4] Voir le tableau IPC dans le certificat d'analyse.

Interprétation des résultats

Cible PPA (fluorophore FAM™)	Cible IPC (fluorophore VIC™)	Interprétation
$C_t < 45$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45$	La PPA est détectée.
$C_t > 45$	$C_t = C_t$ du contrôle d'extraction $\pm 3 C_t^{[1]}$	La PPA n'est pas détectée.
$C_t > 45$	C_t est en dehors de cette plage : C_t du contrôle d'extraction $\pm 3 C_t^{[1]}$	Résultat invalidé. ^[2]

^[1] La valeur C_t du contrôle d'extraction doit d'abord être validée comme décrit dans le paragraphe "Critères de validation" en page 3.

^[2] L'échantillon sera rendu comme non validé en raison de la valeur non conforme de l'IPC.

Retester les échantillons ayant des résultats invalidés

1. Diluer les échantillons d'ADN au 1:10 dans un tampon TE 1X.
2. Recommencer la procédure de PCR temps réel avec 5 μ l de l'ADN dilué, puis interpréter les résultats comme suit.

Résultat	Interprétation
L'ADN dilué est positif pour la PPA.	Le résultat est validé.
L'ADN dilué est négatif pour la PPA, et le résultat IPC est conforme.	
L'ADN dilué est négatif pour la PPA, mais le résultat IPC n'est pas conforme.	Le résultat n'est pas validé.

3. Pour des échantillons dilués dont les résultats sont invalidés, recommencer la procédure d'isolement d'ADN avec un nouvel aliquot du lysat de l'échantillon d'origine, puis répétez le test.

Bonnes pratiques de laboratoire pour la PCR et la RT-PCR

Lors de la préparation d'échantillons pour l'amplification PCR ou RT-PCR :

- Porter des gants et une blouse de laboratoire propres.
 - Ne pas porter les mêmes gants et la même blouse que ceux précédemment portés pour manipuler des produits amplifiés ou préparer des échantillons.
- Changer systématiquement de gants en cas de doute quant à leur contamination possible.
- Maintenir des zones distinctes ainsi que des équipements et des fournitures dédiés pour les types suivants :
 - Préparation des échantillons et configuration de la réaction
 - Amplification et analyse des produits
- Ne pas introduire les produits amplifiés dans la zone pré-PCR de la réaction.
- Ouvrir et fermer tous les tubes d'échantillon avec soin. Éviter toute projection ou création d'aérosols.
- Maintenir les composants et les réactifs fermés dans la mesure du possible.
- Utiliser une pipette à filtre à déplacement positif et des cônes de pipette réactionnels.
- Nettoyer régulièrement les paillasses et équipements de laboratoire avec une solution à 10 % d'eau de javel ou une solution de décontamination de l'ADN.

Certification de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE)



Validé et certifié par l'OIE comme étant apte aux emplois prévus dans cette notice. Numéro d'enregistrement : 20200114.



Fabricant : Laboratoire Service International (LSI) | 6 Allée des Ecureuils – Parc Tertiaire de Bois-Dieu | 69380 Lissieu – France

Traduit de l'anglais, publication numéro MAN0010783 Rév. C.0.

Les informations contenues dans ce guide sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

CLAUDE DE NON-RESPONSABILITÉ : DANS LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, LIFE TECHNOLOGIES ET/OU SA OU SES FILIALE(S) NE SAURAIENT ÊTRE TENUES RESPONSABLES DE DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PUNITIFS, MULTIPLES OU CONSÉCUTIFS LIÉS AU PRÉSENT DOCUMENT OU A SON USAGE OU EN RÉSULTANT.

Historique des révisions: Pub. N° MAN0010783 (anglais)

Révision	Date	Description
C.0	21 juillet 2020	Ajout du logo de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et du numéro d'enregistrement.
B.0	8 février 2018	<ul style="list-style-type: none">• Mise à jour du modèle de document actuel, avec les mises à jour associées à la garantie, aux marques commerciales et aux logos.• Modifications mineures pour s'aligner sur le style actuel.
A.0	2 avril 2015	Référence pour l'historique des révisions.

Informations importantes sur les licences : Ces produits peuvent être couverts par une ou plusieurs licences à usage limité. En utilisant ces produits, vous acceptez les conditions générales de toutes les licences à usage limité.

©2020 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques sont la propriété de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales, sauf indication contraire. TaqMan est une marque déposée de Roche Molecular Systems, Inc., utilisée sous autorisation et licence.

Assistance à la clientèle et support technique

Visiter [thermofisher.com/support](https://www.thermofisher.com/support) pour obtenir les informations les plus récentes sur les services et le support, notamment :

- Numéros de téléphone de contact internationaux
- Support produit, dont :
 - FAQ relatives aux produits
 - Logiciels, correctifs et mises à jour
 - Formations sur de nombreux instruments et applications
- Commandes et assistance en ligne
- Documentation produit, dont :
 - Guides de l'utilisateur, manuels et protocoles
 - Certificats d'analyse
 - Fiches de données de sécurité (FDS)

Remarque : Pour obtenir les FDS relatives aux réactifs et produits chimiques d'autres fabricants, contacter ces derniers.

Garantie limitée du produit

Life Technologies Corporation et ses filiales garantissent leurs produits selon les termes et conditions générales de ventes disponibles sur le site : www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : www.thermofisher.com/support.