

# virotype<sup>®</sup> BVDV RT-PCR Kit Manuel

Pour la détection de l'ARN du *Bovine Viral  
Diarrhea Virus*

Sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur  
l'hygiène vétérinaire : FLI-B 451

**REF** 24 réactions (réf. VT280373)

**REF** 96 réactions (réf. VT280375)

**REF** 480 réactions (réf. VT280377)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,  
04103 Leipzig, Allemagne

# Sommaire

Contenu du kit.....	3
Utilisation prévue .....	3
Symboles .....	4
Contrôle qualité.....	5
Stockage .....	5
Informations de sécurité .....	5
Introduction .....	6
Principe.....	7
Extraction de l'ARN.....	8
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur.....	10
Remarques importantes .....	11
Précautions générales .....	11
Protocole : RT-PCR en temps réel pour la détection de l'ARN du <i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i> .....	13
Points importants avant de commencer .....	13
À effectuer avant de commencer.....	13
Procédure .....	14
Analyse et interprétation des données .....	17
Interprétation des résultats .....	17
Historique des modifications.....	19

## Contenu du kit

<b>virotype BVDV RT-PCR Kit</b>	<b>(24)</b>	<b>(96)</b>	<b>(480)</b>
<b>Réf.</b>	<b>VT28037</b>	<b>VT280375</b>	<b>VT280377</b>
<b>Nombre de réactions</b>	<b>3</b>	<b>96</b>	<b>480</b>
	<b>24</b>		
PCR Mix (mélange PCR) (tube avec bouchon jaune) comprenant les amorces, les sondes et le contrôle interne	1 x 500 µl	2 x 1000 µl	6 x 1650 µl
Enzyme Mix (mélange d'enzymes) (tube avec bouchon vert)	1 x 6,5 µl	1 x 26 µl	2 x 65 µl
Positive Control (contrôle positif) (tube avec bouchon rouge)	1 x 25 µl	1 x 150 µl	2 x 150 µl
Negative Control (contrôle négatif) (tube avec bouchon bleu)	1 x 25 µl	1 x 150 µl	1 x 300 µl
Manuel	1	1	1

## Utilisation prévue

Le virotype BVDV RT-PCR Kit est destiné à la détection de l'ARN du *Bovine Viral Diarrhea Virus* dans des échantillons bovins de sang, de plasma, de sérum, de lait et de tissu d'oreille (individuels ou en pools).

Ce kit est approuvé par le Friedrich-Loeffler-Institut et octroyé sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur l'hygiène

vétérinaire (FLI-B 451) pour une utilisation en Allemagne à des fins de procédures diagnostiques en médecine vétérinaire.

**Réservé exclusivement à un usage vétérinaire.**

## Symboles



Fabricant légal



Numéro de lot



À utiliser avant le



Limites de température pour le stockage



Manuel



Numéro de référence



Référence de matériel



Conserver à l'abri de la lumière



Pour les échantillons prélevés sur les bovins

# Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO d'INDICAL, chaque lot de virotype BVDV RT-PCR Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

# Stockage

Les composants du virotype BVDV RT-PCR Kit doivent être conservés à une température comprise entre -30°C et -15°C et sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter la congélation et décongélation à répétition (plus de deux fois), car cela pourrait réduire la sensibilité des tests. Congeler les composants en aliquotes s'ils ne sont utilisés que de façon intermittente.

# Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles auprès des représentants d'INDICAL ou sur demande par e-mail à l'adresse **[compliance@indical.com](mailto:compliance@indical.com)**.

Tous les résidus d'échantillons et les objets qui ont été en contact avec les échantillons doivent être décontaminés ou éliminés comme des substances présentant un risque potentiel d'infection.

# Introduction

La diarrhée virale bovine (Bovine Viral Diarrhoea, BVD) et la maladie des muqueuses (Mucosal Disease, MD) sont provoquées par le *Bovine Viral Diarrhoea Virus* (BVDV I et II), un virus à ARN simple brin. Celui-ci appartient au genre *Pestivirus*, tout comme le *Classical Swine Fever Virus* et le *Border Disease Virus* chez les ovins.

La BVD est une maladie infectieuse qui touche les bovins et a des répercussions économiques importantes. Selon le statut immunitaire des animaux, les infections au BVDV peuvent entraîner des symptômes gastro-intestinaux et respiratoires de gravité variable, ainsi que des problèmes de reproduction. Ces derniers sont causés par l'infection transplacentaire du fœtus entraînant des avortements spontanés, des malformations congénitales et, dans le cas d'une infection survenant avant l'immunocompétence, des veaux infectés permanents immunotolérants (IPI ou virémiques). Il n'y a pas de veaux IPI sans infection prénatale, tandis que les infections postnatales donnent lieu à une virémie passagère, provoquant la production d'anticorps neutralisants.

Les animaux IPI qui ne sont pas identifiés comme tels sont responsables de la propagation du virus de la BVD puisqu'ils excrètent de fortes doses de virus tout au long de leur vie. Ils peuvent donc infecter des bêtes en gestation qui, à leur tour, donnent naissance à des veaux IPI. La principale façon de lutter avec succès contre la maladie consiste à identifier les animaux IPI de façon précoce.

# Principe

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la RT-PCR en temps réel, le produit amplifié est détecté au moyen de fluorophores.

Ceux-ci sont généralement liés à des sondes oligonucléotidiques qui se lient spécifiquement au produit amplifié. La surveillance des intensités de la fluorescence pendant l'analyse PCR (c.-à-d. en temps réel) permet la détection de l'accumulation de produit sans avoir à rouvrir les tubes de réaction par la suite.

Le virotype BVDV RT-PCR Kit contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ARN du BVDV, y compris un contrôle positif et un contrôle négatif. Avec ce kit, la transcription inverse et l'analyse PCR sont toutes deux effectuées dans un même tube de réaction, ce qui réduit le risque de contamination.

Le kit utilise deux combinaisons amorce/sonde spécifiques : l'une pour les pestivirus générant une fluorescence FAM™ et l'autre pour le contrôle interne générant une fluorescence HEX™. Ce contrôle interne exclut la possibilité de résultats faux négatifs.

# Extraction de l'ARN

Le virotype BVDV RT-PCR Kit est une solution hautement sensible pour la détection de l'ARN du *Bovine Viral Diarrhea Virus* dans des échantillons bovins de sang, de plasma, de sérum, de lait et de tissu d'oreille.

Il est préférable d'utiliser du plasma EDTA, car l'ARN viral est dégradé de façon minimale en présence d'EDTA. Grâce à la grande sensibilité du test, il est possible d'analyser des pools comprenant 50 échantillons sanguins individuels (sang, plasma, sérum), des pools de 100 échantillons de lait individuels et des pools d'échantillons de tissus d'oreille comprenant 25 échantillons individuels. Toutefois, la taille optimale de pool dépend de la prévalence régionale du virus de la BVD et de l'âge des animaux.

Avant la RT-PCR en temps réel, l'ARN viral doit être extrait de la substance de départ. INDICAL propose une gamme de kits validés pour l'extraction de l'ARN et de l'ADN à partir d'échantillons animaux.

- QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit
- cador® Pathogen 96 QIAcube® HT Kit
- MagAttract® 96 cador® Pathogen Kit

En outre, les kits d'extraction suivants peuvent être achetés chez QIAGEN GmbH.

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit
- RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit

Si la RT-PCR en temps réel n'est pas effectuée immédiatement après l'extraction, conserver l'ARN à une température de -20°C, ou de -70°C en cas de stockage plus long.

Pour une préparation rapide d'échantillons de tissu d'oreille (d'un diamètre de 2 à 3 mm) sans isolement de l'ARN, nous recommandons l'utilisation de virotype Tissue Lysis Reagent. Les lysats de tissu d'oreille doivent être conservés à une température de -20°C ou entre 2°C et 8°C pendant une période maximale de 12 heures.

L'extraction de l'ARN à l'aide de kits basés sur la technologie des colonnes à centrifuger peut être automatisée par l'intermédiaire du QIAcube®.

# Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Pipettes
- Pointes de pipette stériles exemptes de nucléase et aérosol-résistantes avec filtres
- Tubes Eppendorf® stériles de 1,5 ml
- Consommables exempts de nucléase (sans RNase/DNase). Des précautions particulières doivent être prises pour éviter qu'une nucléase ne contamine les réactifs et les consommables utilisés pour configurer la PCR en vue de l'identification sensible des acides nucléiques viraux.
- Dispositif de refroidissement ou glace
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de 1,5 ml
- Thermocycleur en temps réel avec canaux de détection de la fluorescence appropriés
- Logiciel approprié pour le thermocycleur en temps réel choisi
- Tubes en barrettes avec bouchons, ou microplaque 96 puits à fond optique avec film optique scellant ou couvercle pour le thermocycleur en temps réel choisi

# Remarques importantes

## Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- Utiliser des pointes de pipette stériles exemptes de nucléase avec filtres.
- Conserver et procéder à l'extraction du matériel positif (prélèvements, contrôles positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs, puis les ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongeler tous les composants sur de la glace avant de lancer un test.
- Lorsqu'ils sont décongelés, mélanger les composants en retournant les tubes et les passer brièvement à la centrifugeuse.
- Ne pas utiliser les composants du kit de test après la date de péremption.
- Conserver les échantillons et les contrôles sur de la glace ou dans un bloc de refroidissement pendant la préparation des réactions.

## Contrôle négatif

Chaque analyse PCR doit comprendre au moins un contrôle négatif. Cela permet d'évaluer la contamination dans la réaction. Il faut noter que l'ARN du contrôle interne est détecté dans le contrôle négatif puisqu'il fait partie du mélange réactionnel à titre de contrôle de l'amplification (voir « Contrôle interne » ci-dessous).

## Contrôle positif

Lors de l'analyse PCR sur des échantillons inconnus, il est recommandé d'effectuer une réaction de contrôle positif dans l'analyse PCR, avec un échantillon connu pour inclure l'ARN viral ciblé. Un contrôle positif sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel. Utiliser 5 µl de Positive Control fourni avec le virotype BVDV RT-PCR Kit pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

## Contrôle interne

À des fins de commodité, l'ARN du contrôle interne est déjà contenu dans les réactifs fournis. Cela évite d'avoir à ajouter le contrôle interne à chaque échantillon séparément lors de la préparation de la réaction. Le contrôle interne permet à l'utilisateur de surveiller l'inhibition de la PCR.

# Protocole : RT-PCR en temps réel pour la détection de l'ARN du *Bovine Viral Diarrhea Virus*

## Points importants avant de commencer

- Lire les « Remarques importantes » page 10 avant de commencer.
- Inclure au moins un contrôle positif (Positive Control) et un contrôle négatif (Negative Control) dans chaque analyse PCR.
- Avant de commencer la procédure, lire complètement le protocole et s'assurer de bien comprendre le fonctionnement du thermocycleur PCR en temps réel choisi.
- L'ARN est instable. Effectuer le protocole sans interruption.

## À effectuer avant de commencer

- Décongeler tous les réactifs sur de la glace et les conserver à l'abri de la lumière.
- Conserver les réactifs sur de la glace pendant la préparation de l'analyse PCR.
- Sortir le mélange d'enzymes Enzyme Mix du congélateur à -20°C immédiatement avant de l'utiliser. Le conserver sur de la glace. Le remettre au congélateur à -20°C immédiatement après l'utilisation.
- Centrifuger brièvement les réactifs avant de les utiliser.

## Procédure

1. Préparer le Master Mix conformément au tableau 1.

Le Master Mix contient tous les composants nécessaires pour la PCR, excepté l'échantillon. Préparer un volume de Master Mix supérieur d'au moins 10 % à ce qui est nécessaire pour le nombre total d'analyses PCR à effectuer.

Voir le tableau 1 pour les volumes par nombre de réactions pour le Master Mix.

Tableau 1. Préparation du Master Mix

Composant	Nombre de réactions			
	1	24	96	480
PCR Mix (bouchon jaune)	19,75 µl	493,75 µl	1 896 µl	9 480 µl
Enzyme Mix (bouchon vert)	0,25 µl	6,25 µl	24 µl	120 µl
<b>Volume total</b>	<b>20 µl</b>	<b>500 µl</b>	<b>1 920 µl</b>	<b>9 600 µl</b>

2. Pipetter 20 µl de Master Mix dans chaque tube de réaction. Ajouter ensuite 5 µl de l'ARN échantillon (tableau 2).

Ajouter la réaction de contrôle positif et la réaction de contrôle négatif.

Contrôle positif : utiliser 5 µl de Positive Control à la place de l'ARN échantillon.

Contrôle négatif : utiliser 5 µl de Negative Control à la place de l'ARN échantillon.

Tableau 2. Préparation du mélange réactionnel

<b>Composant</b>	<b>Volume</b>
Master Mix	20 µl
Échantillon	5 µl
<b>Volume total</b>	<b>25 µl</b>

3. Fermer les tubes de réaction avec les bouchons correspondants.
4. Configurer les filtres des marqueurs de fluorescence dans le logiciel du thermocycleur conformément au tableau 3.

Tableau 3. Configuration des filtres pour le marqueur

<b>Agent pathogène/contrôle interne</b>	<b>Marqueur</b>	<b>Rotor-Gene Q</b>
BVDV	FAM	vert
Contrôle interne	HEX/ JOE <sup>1</sup>	jaune
Référence passive <sup>2</sup>	ROX	-

<sup>1</sup> Utiliser l'option correspondant à votre thermocycleur.

<sup>2</sup> Référence interne pour utilisation sur Applied Biosystems® 7500.

5. Suivre le protocole RT-PCR en temps réel conformément au tableau 4.

Tableau 4. Protocole RT-PCR en temps réel pour le BVDV

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
<b>Transcription inverse</b>	50 °C	20 min	1
<b>Activation initiale</b>	95 °C	15 min	1
<b>Cycle en 3 étapes</b>			
Dénaturation	95 °C	30 s	
Hybridation*	57 °C	45 s	40
Extension	68 °C	45 s	

\* Collecte des données de fluorescence. Durée d'analyse approximative de 2 h 38 min (Rotor-Gene Q)

# Analyse et interprétation des données

## Interprétation des résultats

Pour que le test soit valide, le Positive Control doit produire un signal sur les canaux FAM et HEX avec un  $C_T^1 < 36$ . Le Negative Control ne doit pas produire de signal sur le canal FAM.

Les résultats suivants sont possibles si l'on travaille avec des échantillons inconnus. Les résultats possibles des échantillons sont aussi résumés dans le tableau 5, page 19.

**L'échantillon est positif au BVDV, et le test est valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon produit un signal sur les canaux FAM et HEX.
- Le Positive Control produit un signal sur les canaux FAM et HEX.
- Le Negative Control produit un signal sur le canal HEX avec un  $C_T < 36$ .
- Le Negative Control ne produit pas de signal sur le canal FAM.

Il faut noter que de très fortes concentrations d'ARN du virus de la BVD dans l'échantillon peuvent donner lieu à un signal HEX atténué ou absent en raison de la compétition avec le contrôle interne. Si la valeur  $C_T$  de la fluorescence FAM est inférieure à 30, l'échantillon est probablement celui d'un animal infecté permanent immunotolérant (animal IPI).

---

<sup>1</sup> Cycle seuil (CT) : cycle auquel le graphique d'amplification atteint le seuil, c.-à-d. qu'il y a la première augmentation nettement décelable de la fluorescence

**L'échantillon est négatif au BVDV, et le test est valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon produit un signal sur le canal HEX, mais pas sur le canal FAM.
- Le Positive Control produit un signal sur les canaux FAM et HEX.
- Le Negative Control produit un signal sur le canal HEX.
- Le Negative Control ne produit pas de signal sur le canal FAM.

Un signal HEX positif signifie que l'analyse PCR est réussie puisque le contrôle interne est amplifié.

**Les résultats de l'échantillon sont non concluants, et le test est non valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon ne produit aucun signal sur les canaux FAM et HEX.

Si aucun signal n'est détecté sur les canaux FAM (agent pathogène) et HEX (contrôle interne), le résultat n'est pas concluant. L'absence de signal pour le contrôle interne indique une inhibition de la PCR ou d'autres défaillances.

Pour vérifier s'il y a eu inhibition, nous recommandons une dilution à 1:5 de l'ARN échantillon dans de l'eau exempte de nucléase.

Vérifier s'il y a un signal de fluorescence sur le canal FAM pour la réaction du Positive Control. L'absence de signal pour le Positive Control indique une erreur, qui peut être due à une préparation incorrecte du Master Mix ou à des conditions d'analyse erronées.

Tableau 5. Interprétation des résultats\*

Résultat d'échantillon	FAM (BVDV)	HEX (CI)
Positif au BVDV	X	X
Positif au BVDV (fortement positif)	X	
Négatif au BVDV		X
Non concluant		

\* L'interprétation des résultats des échantillons peut être déterminée à condition que des réactions de contrôle positif et négatif soient effectuées. Le Positive Control doit produire un signal sur les canaux FAM et HEX. Le Negative Control doit produire un signal sur le canal HEX. Pour une explication complète des résultats possibles, voir « Analyse et interprétation des données », page 16.

INDICAL propose une gamme de kits ELISA et de kits PCR et RT-PCR en temps réel pour la détection des agents pathogènes chez les animaux.

Consulter le site [www.indical.com](http://www.indical.com) pour plus d'informations sur les produits bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype et virotype.

Pour obtenir des informations actualisées sur la licence et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation INDICAL correspondant.

des modifications

## Contrat de licence limitée pour le virotype BVDV RT-PCR Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel, et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. INDICAL n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site [www.indical.com](http://www.indical.com). Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs INDICAL pour des utilisateurs INDICAL. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par INDICAL. INDICAL ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, INDICAL n'offre aucune garantie que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. INDICAL rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. INDICAL est susceptible de faire appliquer les interdictions de ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les conditions de licence mises à jour, voir [www.indical.com](http://www.indical.com).

**Marques commerciales :** bactotype<sup>®</sup>, cadior<sup>®</sup>, cattletype<sup>®</sup>, flocktype<sup>®</sup>, pigtype<sup>®</sup>, virotype<sup>®</sup> (INDICAL BIOSCIENCE GmbH) ; MagAttract<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup>, RNeasy<sup>®</sup> (QIAGEN GmbH) ; Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 (Applied Biosystems) ; FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup>, ROX<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation) ; Eppendorf<sup>®</sup> (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Les sondes sous licence fabriquées par Integrated DNA Technologies Inc., les noms déposés, les marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

HB-1577-FR-006 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, tous droits réservés.

## Historique des modifications

Manuel	Version	Modification
HB-1577-EN-006	Octobre 2018	modification dans « Interprétation des résultats »
HB-1577-EN-005	Mai 2018	Style INDICAL