

virotype[®] BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit Manuel

Pour la détection de l'ARN du *Virus Bluetongue* (BTV) et du sérotype européen BTV-8

Sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur l'hygiène vétérinaire : FLI-C 114



100 réactions (N° de réf. VT280465)



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

Sommaire

| | |
|--|----|
| Sommaire | 2 |
| Contenu du kit..... | 3 |
| Utilisation prévue..... | 3 |
| Symboles | 4 |
| Contrôle qualité | 4 |
| 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>Virus</i> <i>Bluetongue</i> et du BTV-8 | 13 |
| Points importants avant de commencer | 13 |
| À effectuer avant de commencer | 13 |
| Procédure | 14 |
| Analyse et interprétation des données..... | 16 |
| Interprétation des résultats..... | 16 |
| Historique des modifications | 20 |

Contenu du kit

| | |
|--|-----------------|
| virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit | (100) |
| N° de réf. | VT280465 |
| Nombre de réactions | 100 |
| Master Mix (mélange principal, tube avec bouchon orange) comprend les enzymes, les amorces et les sondes | 1 x 800 µl |
| Positive Control (contrôle positif, tube avec bouchon rouge) | 1 x 150 µl |
| Negative Control (contrôle négatif, tube avec bouchon bleu) | 1 x 150 µl |
| Manuel | 1 |

Utilisation prévue

Le virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit est conçu pour la détection de l'ARN du *Virus Bluetongue* (BTV) et la différenciation du sérotype européen BTV-8 spécifiquement, dans des pools de sang total et de sang de ruminants (de préférence avec anticoagulants, par exemple sang EDTA) et des échantillons de tissus (rate, nœuds lymphatiques) chez les bovins, les moutons et les chèvres.

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-C 114) 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 produit



Conserver à l'abri de la lumière



Pour les échantillons de bovins, moutons et chèvres

Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO d'INDICAL, chaque lot de virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

Stockage

Les composants du virotype BTV pan/8 2.0 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 trois 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**.

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

Le Bluetongue est une maladie des ruminants infectieuse et non contagieuse. L'agent est le *Virus Bluetongue* (BTV), un virus à ARN double brin du genre *Orbivirus*, de la famille *Reoviridae*, incluant 36 sérotypes connus, y compris le BTV atypique. Le BTV est largement répandu à travers le monde. Il affecte principalement les moutons, les bovins et les chèvres. En général, on n'observe des signes cliniques clairs que chez les moutons. Dans les cas graves, la langue peut présenter une hyperémie intense et devenir cyanosée (langue bleue).

Le BTV sérotype 8 (BTV-8) a une importance épidémiologique en Europe centrale et est une cause d'épidémies majeures de maladie de la langue bleue récemment. Le virus est transmis par certains moucheron du genre *Culicoides*. En outre, le virus peut se répandre à travers des aiguilles et du matériel chirurgical contaminés.

Principe

La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est identifié 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 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 BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ARN du BTV, y compris un Positive et un Negative Control. 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 virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit utilise trois combinaisons d'amorce/sonde spécifiques :

- Fluorescence FAM™ pour l'ARN de tous les sérotypes de BTV connu (pan BTV)
- Fluorescence Cy[®]5 pour l'ARN de sérotype 8 européen (BTV-8)
- Fluorescence JOE™ pour le contrôle interne endogène (EC ; β -actine présente dans l'échantillon)

Un Positive Control contient de l'ARN de BTV-8 et permet de contrôler l'étape de dénaturation, car la dénaturation réussie de l'ARN double brin viral est requis pour l'amplification.

Extraction de l'ARN

Le virotype BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit peut être utilisé pour la détection de l'ARN de BTV dans du sang total de ruminant (de préférence avec anticoagulants, par exemple sang EDTA) et des échantillons de tissus (rate, nœuds lymphatiques) de bovins, moutons et chèvres.

La sensibilité élevée du test permet d'analyser des pools contenant jusqu'à 10 échantillons de sang individuels. Cependant, la taille de pool optimale dépend de la prévalence régionale du BTV.

Remarque : pour une utilisation en Allemagne, les spécifications décrites dans la « *Amtliche Methodensammlung* » s'appliquent.

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 à partir d'échantillons animaux.

Extraction basée sur des billes magnétiques :

- **IndiMag® Pathogen Kit** (SP947457)
- **IndiMag Pathogen Kitw/o plastics** (SP947257)
- **IndiMag Pathogen IM48 Cartridge** (SP947654P608, SP947654P224)
- **IndiMag Pathogen KF96 Cartridge** (SP947855P196)

Extraction basée sur des colonnes de centrifugation :

- **IndiSpin® Pathogen Kit** (SP54104, SP54106)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161)

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 de plus amples informations sur l'extraction automatisée et manuelle de l'ARN du BTV à partir de différents types d'échantillons, veuillez consulter le manuel correspondant ou contacter l'assistance INDICAL à l'adresse **support@indical.com**.

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.

Negative control

Au moins une réaction de Negative Control contenant tous les composants de la réaction, à l'exception de la matrice pathogène, doit être incluse dans chaque analyse PCR. Cela permet d'évaluer la contamination dans la réaction.

Positive control

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 Positive Control 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 BTV pan/8 2.0 RT-PCR Kit pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

Contrôle d'extraction et d'amplification

Pour améliorer la commodité et la sécurité des processus, un dosage de contrôle de l'extraction et de l'amplification est inclus dans le kit d'analyse.

Un contrôle interne endogène (EC) détecte le gène de β -actine présent dans l'échantillon. Cela permet de surveiller l'extraction et l'amplification.

Protocole : RT-PCR en temps réel pour la détection de l'ARN du *Virus Bluetongue* et du BTV-8

Points importants avant de commencer

- Lire les « Remarques importantes » à la page 11 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. Exécuter 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.
- Centrifuger brièvement les réactifs avant de les utiliser.
- Maintenir les réactifs sur la glace ou dans un bloc réfrigérant pendant la préparation de la PCR.

Procédure

1. Pipeter 5 µl d'échantillons d'ARN, de Positive Control et de Negative Control dans des tubes de réaction individuels. Couvrir les tubes de réaction (p. ex. avec un film de scellage de PCR).

Ajouter la réaction de Positive Control et la réaction de Negative Control.

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

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

2. Dénaturer les échantillons et contrôles pendant 5 min à 98 °C dans un thermocycleur standard à plaque de 96 puits avec un couvercle chauffant.
3. Refroidir immédiatement sur de l'eau glacée ou de l'azote liquide pendant au moins 20 s. Puis stocker sur de la glace ou dans un appareil de refroidissement.
4. Avant utilisation, mélanger le Master Mix en l'inversant 5 fois ou jusqu'à ce qu'il soit bien mélangé, puis centrifuger brièvement pour recueillir les fluides.
5. Pipeter 8 µl de Master Mix dans chaque tube de réaction. Le volume final d'un test est de 13 µl (tableau 1).

Tableau 1. Préparation du mélange réactionnel

| Composant | Volume |
|---------------------|--------------|
| Master Mix | 8 µl |
| Échantillon | 5 µl |
| Volume total | 13 µl |

6. Fermer les tubes de réaction avec les bouchons correspondants.
7. Inverser plusieurs fois les tubes fermés jusqu'à ce qu'ils soient bien mélangés et faire brièvement tourner vers le bas.

8. Configurer les filtres des marqueurs de fluorescence dans le logiciel du thermocycleur conformément au tableau 2.

Tableau 2. Configuration des filtres pour le marqueur

| Agent pathogène/contrôle interne | Marqueur |
|----------------------------------|------------------------|
| pan BTV | FAM |
| BTV-8 | Cy5 |
| Contrôle interne endogène (EC) | HEX/ JOE™ ¹ |
| Référence passive ² | ROX™ |

1 Utiliser l'option correspondant à votre thermocycleur.

2 Référence interne à utiliser avec les systèmes de détection de séquences ABI PRISM® (Applied Biosystems®)

9. Exécuter le protocole PCR en temps réel conformément au tableau 3.

Tableau 3. Protocole RT-PCR en temps réel pour le BTV pan/8 2.0

| Étape | Température | Durée | Nombre de cycles |
|------------------------------|-------------|--------|------------------|
| Transcription inverse | 50 °C | 10 min | 1 |
| Activation initiale | 95 °C | 2 min | 1 |
| Cycle en 2 étapes | | | |
| Dénaturation | 95 °C | 5 s | 40 |
| Hybridation/extension* | 60 °C | 30 s | |

* Collecte des données de fluorescence, durée d'exécution approximative 67 min (CFX96, Bio-Rad™).

Analyse et interprétation des données

Interprétation des résultats

Pour que le test soit valide, le Positive Control doit émettre un signal sur les canaux FAM et HEX/JOE avec un $C_T^1 < 35$. Si aucun signal FAM et Cy5 des Positive Controls n'est mesuré les étapes de dénaturation et de refroidissement étaient insuffisantes et le test doit être réitéré. Le Negative Control ne doit pas produire de signal.

Les résultats suivants sont possibles si l'on travaille avec des échantillons inconnus. Les résultats possibles des échantillons sont aussi résumés dans le tableau 4, page 18.

L'échantillon est positif pour le pan BTV et le BTV-8, et le dosage est valide si les critères suivants sont remplis :

- L'échantillon produit un signal sur les canaux FAM, Cy5 et HEX/JOE.
- Le Positive Control donne un signal dans tous les canaux.
- Le Negative Control ne produit aucun signal, quel que soit le canal.

Il faut noter que de très fortes concentrations d'ARN de BTV-8 ou la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon peuvent donner lieu à un signal HEX/JOE atténué ou absent en raison de la concurrence avec le contrôle interne.

¹ Cycle seuil (C_T) : 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 positif pour le pan BTV et négatif pour le BTV-8, et le dosage est valide si les critères suivants sont remplis :

- L'échantillon produit un signal sur le canal FAM et HEX/JOE, mais pas sur le canal Cy5.
- Le Positive Control donne un signal dans tous les canaux.
- Le Negative Control ne produit aucun signal, quel que soit le canal.

Il faut noter que de très fortes concentrations d'ARN de BTV-8 ou la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon peuvent donner lieu à un signal HEX/JOE atténué ou absent en raison de la concurrence avec le contrôle interne.

L'échantillon est négatif pour le pan BTV et le BTV-8, et le dosage est valide si les critères suivants sont remplis :

- L'échantillon produit un signal seulement sur le canal HEX/JOE.
- Le Positive Control donne un signal dans tous les canaux.
- Le Negative Control ne produit aucun signal, quel que soit le canal.

Un signal HEX/JOE positif exclut la possibilité d'une inhibition de la PCR et/ou une extraction de l'ARN incorrecte quand 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 aucun des canaux de fluorescence.

Si aucun signal n'est détecté sur les canaux FAM (pan BTV), Cy5 (BTV-8) et HEX/JOE (contrôle interne endogène, EC), le résultat n'est pas concluant. L'absence de signal pour le gène domestique indique une inhibition forte de la PCR et/ou d'autres défaillances, p.ex. au cours de l'extraction.

Pour vérifier la présence d'une inhibition, nous recommandons de diluer l'échantillon d'ARN au 1:5 dans de l'eau exempte de nucléase, de répéter la procédure d'extraction de l'ARN ou de répéter l'ensemble de la procédure d'analyse en commençant par un nouvel échantillon.

Vérifier s'il y a un signal de fluorescence sur tous les canaux pour la réaction du contrôle positif (Positive Control). L'absence de signal pour le Positive Control indique une erreur, qui peut être attribuable à une dénaturation incorrecte de l'ARN ou à des conditions d'analyse erronées.

Tableau 4. Tableau d'interprétation des résultats*

| Résultat d'échantillon | FAM (pan BTV) | Cy5 (BTV-8) | HEX (EC) |
|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|
| Positif pour le pan BTV | X | | (X) |
| Positif pour le pan BTV et le BTV-8 | X | X | (X) |
| Négatif pour le BTV | | | 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 dans les canaux FAM, Cy5 et HEX/JOE. Le Negative Control ne doit produire aucun signal, quel que soit le canal. 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 pour plus d'informations sur les produits afosa, bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype, Svanovir 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.

Contrat de licence limitée pour le virotype BTV pan/8 2.0 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. 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 tenue 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, consultez www.indical.com.

Marques commerciales : afosa[®], bactotype[®], cador[®], cattletype[®], flocktype[®], pigtype[®], Svanovir[®], virotype[®] (INDICAL BIOSCIENCE GmbH) ; ABI PRISM[®] (Applied Biosystems) ; Bio-Rad[™] (Bio-Rad Laboratories, Inc.) ; FAM[™], HEX[™], JOE[™], ROX[™] (Life Technologies Corporation) ; Cy[®] (GE-Healthcare) ; Eppendorf[®] (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-2578-EN-001 © 2022 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, tous droits réservés.

Historique des modifications

| Manuel | Version | Modification |
|----------------|--------------|----------------------|
| HB-2578-EN-001 | Juillet 2022 | Lancement du produit |