



BTV/EHDV

Référence : ADL73Y1-100 et ADL73Y1-500

Test pour la détection du virus de la Bluetongue (BTV) et du virus de la maladie hémorragique épizootique (ou EHDV, Epizootic haemorrhagic disease Virus) par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 et 500 réactions

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Sang	✓	✓
Organe	✓	✓

* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer).

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADL73Y1	
		100 réactions	500 réactions
A6	Solution d'amplification	1 flacon lyophilisé (A reconstituer)	5 flacons lyophilisés (A reconstituer)
Rehydration buffer	Solution de réhydratation	1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi)	1 x 6 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi)
BTV CTL+	Contrôle positif BTV	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)	2 tubes à bouchon violet (A reconstituer)
EHDV CTL+	Contrôle positif EHDV	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)	2 tubes à bouchon violet (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)	2 x 1000 µL tubes à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
07/2024	V01	Création

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

A. Introduction

La fièvre catarrhale du mouton (ou Bluetongue) est une maladie virale infectieuse non contagieuse due à un Orbivirus (famille Reoviridae, virus ARN) vectorisé par des arthropodes, essentiellement des mouches hématophages du genre *Culicoides*. Il existe plus de 30 sérotypes distincts induisant des protections croisées partielles ou nulles entre eux. La transmission par transfert d'embryons à partir de brebis gestantes a également été décrite. La transmission par injection de sang contaminé peut être possible lors de réutilisation d'aiguilles et de seringues. Les prélèvements de choix pour la mise en évidence du virus sont le sang d'animaux fébriles prélevés sur anticoagulant (EDTA). La présence du virus est mise en évidence par isolement sur œufs embryonnés, culture cellulaire *in vitro*, immunofluorescence en monocouche cellulaire infectée ou par PCR.

Découvert pour la première fois aux États-Unis en 1955, le virus de la Maladie Hémorragique Epizootique (MHE, ou Epizootic Haemorrhagic Disease : EHD en anglais) affecte principalement les bovins et les cervidés. Il existe sept sérotypes différents du virus.

Le virus se transmet également par des mouches piqueuses du genre *Culicoides*. Chez les bovins, les signes cliniques de la MHE sont proches de ceux de la fièvre catarrhale ovine (FCO) et se traduisent par de la fièvre, de l'anorexie, des boiteries, une détresse respiratoire et potentiellement la mort de l'animal. Les petits ruminants peuvent aussi être porteurs du virus.

La détection précoce de ces virus par RT-PCR permet de limiter la propagation des maladies engendrées avant le mouvement d'animaux vers d'autres régions ou pays.

B. Principe du test

Le test ADIALYO™ BTV/EHDV repose sur la transcription réverse (RT) de l'ARN en ADN complémentaire. Cette réaction est suivie de l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques du virus de la Bluetongue (BTV) et du virus de la maladie hémorragique épizootique (EHDV). Il détecte simultanément en monocouple :

- BTV (sonde marquée en FAM).
- EHDV (sonde marquée en HEX ou équivalent).
- GAPDH : un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée en Cy5).

C. Conditions de stockage

A réception, stocker le kit à +2/8 °C et au sec.

Les réactifs reconstitués doivent être aliquotés et stockés à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel.
- Appareil d'homogénéisation pour tubes.
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL.
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes.
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 mL et 2 mL.
- Gants latex ou nitrile non poudrés.
- Eau Nucléase-free.
- Kit d'extraction des acides nucléiques.

Kits complémentaires (sur demande) pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **Extraction Positive Control BTV (Réf. : ADC35EPC) et EHDV (Réf. : ADC72EPC).** Matériel de référence fournisseur pouvant être utilisé comme sentinelle (Calibré entre 1 et 100xLD_{Méthode}).
- *Pour la confirmation des performances LD_{Méthode}, un matériel de référence au Niveau Exigé de Détection (NED) est mis à disposition par le Laboratoire National de Référence (LNR).*
- **LDpcr Positive Control – BTV/EHDV (Réf. : ADC73LD)** Confirmation des performances – LDpcr du kit.

E. Précautions d'utilisation et de sécurité

- Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement.
- Pour usage animal uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Lire l'ensemble du protocole avant de commencer et le respecter scrupuleusement.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption du kit.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

F. Extraction des acides nucléiques

1. Kits d'extractions

Les acides nucléiques doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit. Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés et fournis par Bio-X Diagnostics :

Nom du produit	Technologie d'extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG™	Billes magnétiques	200 tests : réf. NADI003 800 tests : réf. NADI003-XL

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit PCR utilisé.

D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8 °C pendant quelques heures avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.

2. Témoins

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définies par les normes en vigueur (Cf. AFNOR U47-600...).

Contrôles	Validation de	Mode opératoire
Témoin réactif (NTC)	Absence de contamination pour l'amplification	5 µL NF-Water dans un puits par série PCR
BTV CTL+	Amplification de la cible BTV	5 µL BTV CTL+ dénaturé dans un puits par série PCR
EHDV CTL+	Amplification de la cible EHDV	5 µL EHDV CTL+ dénaturé dans un puits par série PCR
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Etapas d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Préparation de la solution d'amplification A6

- Ajouter **1000 µL** de « **Rehydratation buffer** » par tube de A6.
- Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes.
- Après reconstitution, aliquoter et stocker la solution à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.
- Pour l'utilisation, se reporter au § « Amplification », Etape 1.

2. Préparation des CTL+

- Ajouter **200 µL** de « **NF-Water** » par tube.
- Homogénéiser le tube par aspiration refoulement, puis à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.
- Après reconstitution, aliquoter la solution et stocker la solution à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.
- Pour chaque analyse, utiliser **5 µL** du CTL+ dénaturé (se reporter au § dénaturation) dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).
Note : il est possible de mélanger volume à volume les 2 CTL+. Dans ce cas, 5 µL du mélange dénaturé est ajouté dans un des puits dédiés.

3. Dénaturation des acides nucléiques

- Pour chaque échantillon extrait et contrôles, transférer 10 µL d'acides nucléiques dans un tube ou plaque-96 et stocker le reste à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.
- Incuber 3 minutes at +95 °C dans un thermocycleur ou bloc chauffant.
- Transférer immédiatement les tubes ou plaque-96 sur glace ou bloc réfrigérant jusqu'à son utilisation (évite la renaturation de l'ARN).
- Pour l'utilisation, se reporter au § « Amplification », Etape 2.

4. Amplification

Attention :

- Avant de commencer, décongeler les réactifs à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Homogénéiser tous les réactifs et échantillons avant utilisation.
- Replacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

Étape 1 : Répartir **10 µL** de réactif d'amplification A6 dans chaque puits PCR.

Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits dénaturés des échantillons et **5 µL** de contrôles dénaturés dans chaque puits dédié. Utiliser 5 µL de NF-Water pour le témoin réactif.

Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Le programme suivant a été développé pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantStudio5, Step-one...) d'Applied Biosystems, pour les Mx3000 et Mx3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics, pour le Rotor-Gene Q de Qiagen, pour le CFX96 et Chromo 4 de Biorad, pour le MIC de BioMolecular System.

Contactez votre représentant commercial ou le service client pour tout autre modèle de thermocycleur.

Programme ADN/ARN	
10 min. 45 °C	
2 min. 95 °C	
5 sec. 95 °C	40 cycles
30 sec. 60 °C*	

Le programme suivant, compatible avec les kits ADIAVET™ BTV TYPE 1 REAL TIME (ADI391), BTV TYPE 3 REAL TIME (ADI711), BTV TYPE 4 REAL TIME (ADI541) et BTV TYPE 8 REAL TIME (ADI381) a également été validé :

Programme ARN FAST	
10 min. 45 °C	
10 min. 95 °C	
5 sec. 95 °C	40 cycles
30 sec. 60 °C*	

*Lecture et paramètres pour l'acquisition de la fluorescence :

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	538	554
Cy5	646	662
ROX	575	602

Note : Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive lue dans le spectre du ROX pour les appareils ABI Prism.

Afin d'éviter un problème d'interprétation, il est obligatoire de sélectionner les 3 fluorochromes (FAM, HEX ou équivalent et Cy5), même en cas d'analyse individuelle de BTV ou d'EHDV. Une non-sélection d'un fluorochrome (FAM ou HEX) peut provoquer une mauvaise lecture de la fluorescence par le logiciel, conduisant à des faux positifs sur le fluorochrome sélectionné.

H. Interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes et positionner la ligne de seuil pour chaque fluorochrome.

1. Validation de l'essai

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus.

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour les CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification			Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	Cy5	
Témoin réactif (NTC)	Non	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
BTV CTL+	Oui	Non	Oui/Non	Amplification de la cible BTV
EHDV CTL+	Non	Oui	Oui/Non	Amplification de la cible EHDV
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction BTV	Oui	Non	Oui/Non	Etapes d'extraction et d'amplification de la cible BTV
Témoin positif d'extraction EHDV	Non	Oui	Oui/Non	Etapes d'extraction et d'amplification de la cible EHDV

2. Interprétation des résultats

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM, Cy5 et/ou HEX ou équivalent. **Pour rappel, l'analyse des trois fluorochromes est nécessaire pour éviter une mauvaise interprétation du logiciel.**

Amplification			Interprétation	
FAM	HEX ou équivalent	Cy5	BTV	EHDV
Non	Non	Oui Ct < 33	Non détecté	Non détecté
Oui Ct < 34	Oui Ct < 34	Oui	Détecté	Détecté
Oui Ct < 34	Non	Oui	Détecté	Non détecté
Non	Oui Ct < 34	Oui	Non détecté	Détecté
Oui 34 ≤ Ct < 40	Oui 34 ≤ Ct < 40	Oui	Détecté en faible quantité	Détecté en faible quantité
Oui 34 ≤ Ct < 40	Non	Oui	Détecté en faible quantité	Non détecté
Non	Oui 34 ≤ Ct < 40	Oui	Non détecté	Détecté en faible quantité
Non	Non	Non/Oui Ct ≥ 33	Non déterminé	Non déterminé

« **Détecté en faible quantité** » : Le statut de l'infection ne peut être défini : infection très récente (début de virémie) ou ancienne (fin de virémie).

« **Non déterminé** » : absence de courbe d'amplification caractéristique.

Causes possibles :

PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme, absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) et/ou Déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).

Actions conseillées :

Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/5^{ème} en eau Nucléase-free ;

Si le test n'est toujours pas valide, refaire l'extraction des acides nucléiques en diluant le sang au demi dans du PBS 1X. Finalement, si aucun résultat n'est interprétable, l'échantillon est inexploitable (présence d'inhibiteurs de RT-PCR ; échantillon lysé ou putréfié...).

Table des symboles

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière
	Conserver au sec

- 1 | Extraire les acides nucléiques avec

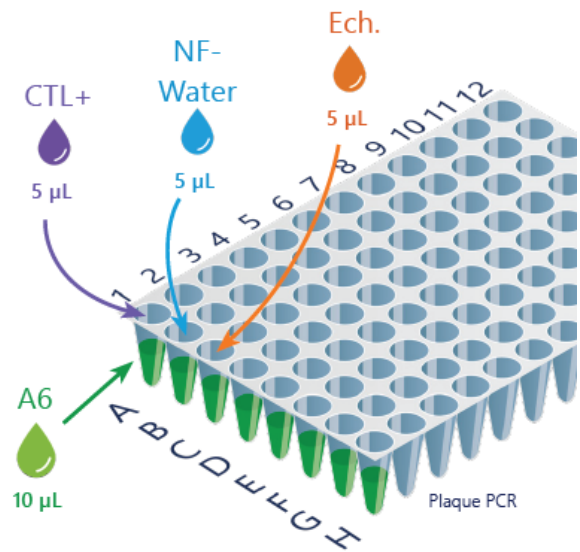


- 2 | Ajouter **1000 µL** de Rehydration buffer au réactif d'amplification **A6**

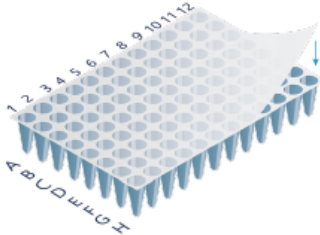


- 3 | Répartir **10 µL** de réactif d'amplification **A6**

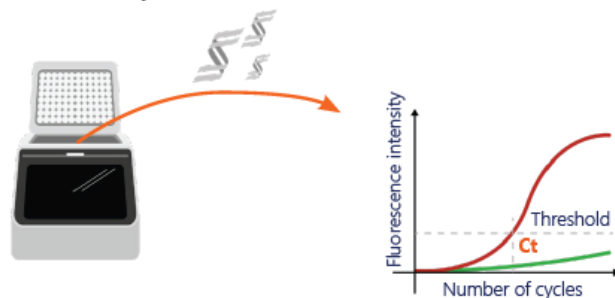
- 4 | Distribuer **5 µL d'acides nucléiques***, **CTL+** et **NF-Water**
- *Dénaturés préalablement 3 min. 95°C*



- 5 | Sceller les puits



- 6 | Démarrer l'analyse PCR



* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.