

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/LSA-INS-1321 - Version 03

Octobre 2024

Identification du virus de l'Artérite Virale Équine par RT-qPCR



Laboratoire de santé animale, site de Normandie

Unité Physiopathologie & Épidémiologie des Maladies Équines (PhEED)

Laboratoire national de référence pour l'Artérite virale équine

Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V0	/	01/12/2011	
V1	Mineures	27/10/2015	Modifications de forme : application du modèle de l'Anses
V2	Mineures	05/07/2016	Page 10 : ajout de la démarche à suivre en cas de témoins non conformes
V3	Mineures	10/2024	Modifications de forme : mise à jour du logo Anses, améliorations rédactionnelles. §5.2. Mise à jour du tableau des produits (nom des kits, packaging) Préparation des échantillons déplacée dans §7. Ajout de la référence à la norme NF U47-600-1 et reprise des définitions pour l'expression des résultats au §9.2.

Avant-propos

La présente méthode a été développée par : Delphine Froger & Aymeric Hans

Anses - Laboratoire de santé animale, site de Normandie

Laboratoire National de Référence « Artérite virale équine »

Adresse : 1180 route de l'Eglise – 14430 Goustranville

Contact : José Carlos Valle-Casuso, chef de l'unité PhEED

Sommaire

Avant-propos	3
Introduction	5
Avertissements et précautions de sécurité	5
1. Objet et domaine d'application	5
2. Documents de référence	5
3. Termes, sigles et définitions	6
4. Principe de la méthode	6
5. Réactifs	6
5.1. Eau	6
5.2. Réactifs.....	6
6. Appareillage et matériels	7
7. Échantillons	7
7.1. Conditions d'acceptation des échantillons.....	7
7.2. Préparation des échantillons pour analyse.....	7
7.3. Conservation des échantillons avant analyse	7
8. Mode opératoire	8
8.1. Extraction de l'ARN viral	8
8.2. Amplification par RT-qPCR	8
8.2.1. Préparation du mélange réactionnel de RT-qPCR	8
8.2.2. RT-qPCR.....	8
9. Résultats	9
9.1. Contrôle qualité.....	9
9.2. Calculs et expression des résultats.....	9
10. Caractéristiques de performance de la méthode	9
10.1. Détermination expérimentale de la LD _{méthode}	9
10.2. Spécificité et sensibilité diagnostiques sur échantillons biologiques de statut connu pour l'AVE	9
Annexe A - Bibliographie	11

Introduction

La détection du virus de l'Artérite Virale Équine par retro-transcription (RT) suivi d'une réaction PCR en temps réel quantitative (qPCR) repose sur l'extraction du génome viral de l'AVE puis sur l'amplification d'une portion du cadre ouvert de lecture 7 (ORF7) codant pour la nucléoprotéine virale.

Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

1. Objet et domaine d'application

Le présent document décrit la technique afin de mettre en évidence la présence ou non du génome du virus de l'Artérite Virale Équine dans l'échantillon à analyser. Cette détection se fait par amplification d'une portion du génome viral par RT-qPCR.

Elle s'applique au diagnostic de la maladie et permet aussi de définir le statut sanitaire des étalons possédant des anticorps reconnaissant le virus de l'artérite virale équine vis-à-vis du virus de l'AVE.

2. Documents de référence

Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

- [1] Udeni B.R.Balasuriya, Christian M. Leutenegger, J.B. Topol, William H. McCollum, Peter J. Timoney, N. James MacLachlan Detection of Equine Arteritis Virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay. *Journal of virological Methods* 101 (2002) 21-38.
- [2] Hans A, Gaudaire D, Manuguerra JC, Leon A, Gessain A, Laugier C, Berthet N, Zientara S. Combination of an unbiased amplification method and a resequencing microarray for detecting and genotyping equine arteritis virus. *J Clin Microbiol.* 2015 Jan;53(1):287-91
- [3] NF U47-600-2. Méthodes d'analyse en santé animale, PCR (réaction de polymérisation en chaîne), Partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale
- [4] NF U47-600-1. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en oeuvre de la PCR en santé animale

3. Termes, sigles et définitions

AVE : Artérite Virale Équine

ORF7 : Open Reading Frame 7 (cadre de lecture 7)

ARN : Acide RiboNucléique

4. Principe de la méthode

L'ARN viral est extrait à partir de l'échantillon en respectant les recommandations fournisseur du coffret utilisé. L'amplification génique par RT-qPCR est ensuite réalisée en ciblant une partie du gène ORF7 codant pour la nucléocapside du virus.

5. Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

5.1. Eau

L'utilisation d'une eau ultrapure est recommandée. Il est possible tout de même d'utiliser une eau dont la qualité est compatible avec les exigences de biologie moléculaire.

5.2. Réactifs

Les références des différents réactifs utilisés au laboratoire sont détaillées à titre indicatif dans le tableau suivant :

Produit	Fabricant	Référence	Packaging
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN	52906	250 réactions
QuantiTect Virus + ROX Vial Kit	QIAGEN	211035	1000 réactions de 50 µl

Les séquences des amorces et de la sonde utilisées pour l'amplification d'une partie du gène ORF7 de l'AVE sont détaillées dans le tableau suivant :

Nom	Séquence	Concentration
Amorce AVE ORF7 F	GGCGACAGCCTACAAGCTACA	10µM
Amorce AVE ORF7 R	CGGCATCTGCAGTGAGTGA	10µM
Sonde AVE ORF7	[6FAM]TTGCGGACCCGCATCTGACCAA[TAM]	10µM

6. Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Thermocycleur Mastercycler® ep *realplex*^{4s} Eppendorf

Systèmes de distribution (pipettes stériles, micropipettes, pipeteur)

Cônes à filtres stériles

Centrifugeuse

Congélateur à température $\leq -15^{\circ}\text{C}$

Enceinte réfrigérée ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$)

Tubes exempts de DNase, RNase et inhibiteurs de PCR (1,5 ml)

Tubes ou plaques PCR

Capuchons plats pour tubes qPCR ou film pour qPCR

7. Échantillons

7.1. Conditions d'acceptation des échantillons

Cette méthode a été caractérisée puis validée pour analyser la fraction de l'éjaculat riche en sperme chez les étalons, le virus n'étant pas présent dans la partie pré-éjaculatoire du sperme. Après avoir recueilli le sperme, il est recommandé de le réfrigérer et de l'acheminer au laboratoire sous régime du froid. Dans le cas où le transport de l'échantillon du site de récolte au laboratoire n'est pas consécutif au prélèvement, l'échantillon peut être congelé à une température égale ou inférieure à -15°C puis transporté dans des conditions réfrigérées.

7.2. Préparation des échantillons pour analyse

À réception, les échantillons de sperme sont centrifugés à 1900 rpm pendant 10 minutes à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Après centrifugation le surnageant est conservé et aliquoté, le culot est éliminé.

7.3. Conservation des échantillons avant analyse

Après avoir traité les échantillons tel que décrit dans le paragraphe 7.2 de cette méthode, les échantillons doivent être conservés dans une enceinte réfrigérée ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) si l'analyse est réalisée dans les 24 heures après réception. Pour une durée supérieure, les échantillons doivent être congelés.

8. Mode opératoire

Toute la manipulation doit se faire sous hotte PCR de la manière la plus « propre » possible afin d'éviter toutes contaminations croisées.

Ne pas oublier de mettre des gants et de les changer fréquemment.

N'utiliser que du matériel propre et travailler dans un environnement propre.

8.1. Extraction de l'ARN viral

L'extraction de l'ARN viral est réalisée à partir de 150 µl du surnageant obtenu en 7.2 selon les recommandations fournisseur du coffret QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN référence 52906).

Pour chaque extraction de l'ARN viral, des témoins doivent systématiquement être inclus : positif, négatif, limite de détection (seuil) et eau (H₂O).

8.2. Amplification par RT-qPCR

8.2.1. Préparation du mélange réactionnel de RT-qPCR

Le volume final du mélange réactionnel de RT-qPCR à préparer dépend du nombre d'échantillons à analyser. La composition de ce mélange pour une réaction est détaillée dans le tableau suivant :

	Volume par réaction de 25 µl
RNase-free water	14,75 µl
5X QuantiTect Virus Master Mix	5 µl
Amorce AVE ORF7 F à 10 µM	1 µl
Amorce AVE ORF7 R à 10 µM	1 µl
Sonde AVE ORF7 à 10 µM	0,5 µl
100X QuantiTect Virus RT Mix	0,25 µl

Une fois préparé, le mélange réactionnel de RT-qPCR doit être conservé dans la glace avant sa répartition dans les puits PCR appropriés.

8.2.2. RT-qPCR

Pour chaque analyse de RT-qPCR, des témoins doivent systématiquement être inclus : positif, négatif, limite de détection (seuil) et eau (H₂O).

- Répartir 22,5 µl de mélange réactionnel de RT-qPCR dans chaque puits PCR.
- Ajouter 2,5 µl d'ARN à analyser (échantillons ou témoins), mélanger par pipetages successifs (il est possible de centrifuger brièvement les tubes ou la plaque).

- Placer les tubes ou la plaque dans le thermocycleur et lancer le programme de RT-qPCR suivant :

20 minutes à 50°C (étape de rétro-transcription)

5 minutes à 95°C

15 secondes à 95°C }
45 secondes à 60°C } 45 Cycles

9. Résultats

9.1. Contrôle qualité

Les résultats des témoins analysés en parallèle des échantillons doivent être conformes par rapport aux résultats attendus. Lorsque les résultats des témoins analysés ne sont pas conformes, l'analyse doit être relancée une nouvelle fois.

9.2. Calculs et expression des résultats

Pour chaque échantillon analysé, le résultat peut être exprimé comme suit :

« Détecté » lorsqu'une bande est observée à la taille attendue sur un gel d'agarose pour une PCR en point final ou lorsqu'une courbe d'amplification caractéristique est observée au cours d'une PCR en temps réel.

« Non détecté » lorsque les témoins sont conformes et qu'aucun signal spécifique de la cible recherchée n'est obtenu.

« Ininterprétable » lorsqu'un ou plusieurs critères d'analyse et d'interprétation du signal ne correspondent pas aux caractéristiques spécifiées attendues

10. Caractéristiques de performance de la méthode

La méthode complète est caractérisée ici par l'utilisation de dilutions sériées de la production virale de référence dans un volume de semence d'étalon connue pour être négative pour l'AVE. Cette méthode permet de prendre en compte l'effet matrice et l'accessibilité du virus dans des conditions proches d'une infection biologique.

10.1. Détermination expérimentale de la LD_{méthode}

La limite de détection de la RT-qPCR AVE complète (LD_{méthode}) est définie comme la plus petite DECP₅₀ de virus pour laquelle les 8 répétitions testées sont positives. La LD_{méthode} déterminée au laboratoire pour cette méthode est de 20 DECP₅₀ de virus AVE dans un volume réactionnel de 150µL de semence négative soit 0,83 doses par réaction de PCR.

10.2. Spécificité et sensibilité diagnostiques sur échantillons biologiques de statut connu pour l'AVE

La spécificité et la sensibilité diagnostiques de la méthode ont été déterminées à l'aide d'un panel composé d'échantillons terrains de semence d'étalons de statut négatif et positif pour l'AVE. Le

statut de chaque échantillon a été préalablement déterminé sur la base des résultats de génotypage permettant la caractérisation complète des isolats viraux. Les échantillons positifs choisis proviennent d'étalons naturellement infectés et dont les virus isolés appartiennent à différents groupes phylogénétiques.

D'après les résultats, la sensibilité et la spécificité diagnostiques observées sont de 100%. De plus, tous les échantillons positifs testés ont été trouvés positifs et ceci indépendamment du groupe phylogénétique auquel ils appartenaient.

Annexe A - Bibliographie

- [1] Udeni B.R.Balasuriya, Christian M. Leutenegger, J.B. Topol, William H. McCollum, Peter J. Timoney, N. James MacLachlan Detection of Equine Arteritis Virus by real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay. *Journal of virological Methods* 101 (2002) 21-38.
- [2] Hans A, Gaudaire D, Manuguerra JC, Leon A, Gessain A, Laugier C, Berthet N, Zientara S. Combination of an unbiased amplification method and a resequencing microarray for detecting and genotyping equine arteritis virus. *J Clin Microbiol.* 2015 Jan;53(1):287-91
- [3] NF U47-600-2 version de février 2015. Méthodes d'analyse en santé animale, PCR (réaction de polymérisation en chaîne), Partie 2 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale
- [4] NF U47-600-1 version de mars 2024. Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en oeuvre de la PCR en santé animale

