

Mix prêt à l'emploi : Simplicité, Rapidité ! ...

### PCR License

This product is offered under a licence for the manufacture and the sale of veterinary PCR products from ROCHE. The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing veterinary in vitro diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

# Kit TaqVet<sup>®</sup> *Toxoplasma gondii*

Réf : TXP

**Pour détection de *Toxoplasma gondii* dans :**

Placenta

Muscle cardiaque

Encéphale

**par utilisation de sondes TaqMan<sup>®</sup>  
en PCR temps réel**

Kit développé en partenariat avec le Laboratoire  
d'Analyses Sèvres Atlantique



**Attention**

**modifications du kit**

**Coffret unique à -20°C à réception**



**LSI**

## **Laboratoire Service International**

**6 Allée des écureuils**

**Parc d'activité du Bois Dieu**

**69380 LISSIEU – France**

**Tel : + (33) 04 72 54 82 82**

**Fax : + (33) 04 72 54 82 83**

**Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 17h.**

**Office open from Monday until Friday : 9 am to 5 pm.**

***Direction / Management***

**Eric SELLAL - [eric@lsivet.com](mailto:eric@lsivet.com)**

**Patricia GIROUD – [Patricia@lsivet.com](mailto:Patricia@lsivet.com)**

***Marketing & commercial / Marketing & commercial***

***Informations commerciales / Commercial Information***

**Lise GREWIS – [lise@lsivet.com](mailto:lise@lsivet.com)**

***Commandes / Orders***

***Livraisons / Delivery***

**Richard GIROUD – [Richard@lsivet.com](mailto:Richard@lsivet.com)**

***Informations PCR / PCR Information***

***Supports Techniques PCR / PCR Technical Information***

**Sandrine Moine – [sandrine@lsivet.com](mailto:sandrine@lsivet.com)**

**Mylène Salus – [mylene@lsivet.com](mailto:mylene@lsivet.com)**

**Julie Charrot – [jcharrot@lsivet.com](mailto:jcharrot@lsivet.com)**

**Stéphane Daly – [sdaly@lsivet.com](mailto:sdaly@lsivet.com)**

**Stéphanie Colin – [stephanie@lsivet.com](mailto:stephanie@lsivet.com)**

***Informations ELISA / ELISA Information***

***Supports Techniques ELISA / ELISA Technical Information***

**Julie Meunier – [julieM@lsivet.com](mailto:julieM@lsivet.com)**

***Informations Légales / Legal Information***

**LSI – Laboratoire Service International**

**SAS au capital de 120 000,00 Euros**

**VAT : FR67380105544**

**RCS : 38010554400031 APE : 244D**

# **Kit TAQVET *Toxoplasma gondii***

## **Sommaire**

	<b>Pages</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>4</b>
<b>II. Réactifs fournis dans le Kit</b>	<b>5</b>
<b>III. Matériel et réactifs non fournis et conseillés</b>	<b>5</b>
<b>IV. Les échantillons</b>	<b>5</b>
<b>V. Extraction de l'ADN</b>	<b>6</b>
<b>VI. Reconstitution des Mix réactionnels</b>	<b>8</b>
<b>VII. Protocole d'amplification</b>	<b>9</b>
<b>VIII. Interprétation des résultats</b>	<b>10</b>

# Kit TAQVET *Toxoplasma gondii*

**Pour détection de *Toxoplasma gondii* dans le placenta, encéphale et le muscle cardiaque par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel.**

Réf : TXP

## I – Introduction

Le kit TAQVET *Toxoplasma gondii* a été développé en partenariat avec le Laboratoire Vétérinaire Départemental des Deux Sèvres. Il permet la détection de la séquence codant pour le gène B1, spécifique du genre *Toxoplasma gondii*.

Chaque échantillon (ADN obtenu après extraction) est analysé en monocupule (détection simultanée) :

- détection spécifique de l'ADN de *Toxoplasma gondii*
- détection de l'IPC (Internal Positive Control) est réalisée dans la même cupule. La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons.

L'IPC est un Internal Positive Control endogène présent dans l'encéphale et le muscle cardiaque.

L'EPC est un Antigène purifié inactivé. L'EPC ne contient pas la séquence de l'IPC. La détection de l'IPC dans l'EPC donnera une réponse nulle.

Le Kit TAQVET *Toxoplasma gondii* contient :

- 1 **mix réactionnel prêt à l'emploi** contenant:
  - 🧪 1 set de Nucléotides *Toxoplasma gondii* :
    - 1 Forward Primer.
    - 1 Reverse Primer.
    - 1 Sonde Toxo – Sonde TaqMan® marquée **FAM – TAMRA**.
  - 🧪 1 set de Nucléotides IPC :
    - 1 Forward Primer.
    - 1 Reverse Primer.
    - 1 Sonde IPC – Sonde TaqMan® marquée **VIC - TAMRA**.
  - 🧪 1 **Master Mix** pour PCR TaqMan® ADN.
- 1 **EPC Toxo** (External Positive Control).

L'extraction et la purification de l'ADN parasitaire sont réalisées sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA Mini Kit (Réf Qiagen 51304) ou le kit **Nucleospin Tissue de Macherey Nagel (50 ou 250 preps, réf Macherey Nagel : 740952.50 ou 740952.250)**.

- Le Kit TAQVET *Toxoplasma gondii* a été validé avec un ABIPRISM® 7000 ou 7700 ou 7900 HT (Applied Biosystems). Le Kit TAQVET *Toxoplasma gondii* est utilisable sur d'autres appareils de PCR en temps réel à condition que l'appareil soit validé par LSI. Merci de nous contacter pour connaître la liste des appareils validés.
- Les résultats sont interprétés en fonction des Ct (Treshold Cycle) obtenus pour chaque échantillon :
  - **Si Ct échantillon < 45**, l'échantillon est positif. Pour des échantillons de même nature, plus le Ct est faible, plus la charge parasitaire contenue dans l'échantillon est importante.
  - **Si Ct échantillon > 45**, l'échantillon est négatif.

## II - Réactifs fournis dans le Kit

Le Kit TAQVET *Toxoplasma gondii* se présente sous la forme d'un UNIQUE coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 50 tests en monocupule. Suite à la 1<sup>ère</sup> utilisation du kit, placer le tube « Mix Toxo » à +4°C. Un kit non utilisé peut-être conservé dans sa globalité (EPC et Mix Toxo) à -20°C.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Code Couleur	Conservation	
			À réception	Après la 1 <sup>ère</sup> utilisation
Mix Toxo	2 Tube de 2 mL	Vert	-20°C	+4°C
EPC Toxo	1 Tube de 0,5 mL	Bleu	-20°C	-20°C

**Mix Toxo** : Mix réactionnel prêt à l'emploi pour PCR TaqMan® *Toxoplasma gondii*.

**EPC Toxo** : External Positive Control *Toxoplasma gondii* : Positif en PCR *Toxoplasma gondii*.

**Attention** : Le Contrôle Négatif utilisé dans la réaction n'est pas fourni dans le Kit. LSI recommande d'utiliser de l'eau DNase RNase Free. **2 types de Contrôle Négatif peuvent être utilisés** :

**1/ NCS : Négative Control Sample** : Eau DNase RNase Free extraite comme un échantillon. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de l'amplification et de l'extraction.

Il est conseillé de doubler au minimum ce contrôle lors de chaque extraction : un NCS en début d'extraction et un autre en fin d'extraction.

**2/ NC : Negative Control** : 20 µl de chaque mix reconstitué dans la plaque d'amplification. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

## III - Matériel et réactifs non fournis et conseillés

Pour l'extraction d'ADN :

- Si extraction sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA mini kit (Ref Qiagen : 51304) :
  - o Une centrifugeuse pour microtubes de type Eppendorf (8 à 15 000 g).
  - o Un vortex ou équivalent.
  - o Micropipette de précision (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL) avec embouts RNase free avec barrière filtrante.
  - o Microtubes RNase et DNase free de 1,5mL (type Eppendorf ou équivalent).
  - o Tubes collecteurs de 2mL.
  - o Ethanol 100%.
  - o Eau DNase et RNase free qui servira de **Contrôle Négatif**.
- Un bloc chauffant une étuve pouvant atteindre une température de 70°C.

Pour l'amplification :

- Un thermocycleur avec son consommable : Microplaque PCRs (microplaques PCR) et Adhesive Covers.

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués.

## IV – Les échantillons

Numéroter ou identifier les tubes ou les microtubes qui contiendront les échantillons ou les extraits.

### Les prélèvements

Type échantillon	Matériel prélevé
Placenta	20 mg
Encéphale	20 mg
Muscle cardiaque	20 mg

## 1/ Placenta :

Le placenta peut être utilisé frais, conservés à +4°C (8 jours maximum) ou congelés à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

- **Préparation du placenta :**

1. Disséquer finement le morceau de placenta dans une boîte de Petri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile ou broyer au Mixer Mill l'échantillon dans un tube de 2 ml contenant des billes de 3 mm et de la poussière de billes.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 mg** maximum du placenta préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/-1 mg).

*L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **20 mg (maximum) de placenta** - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.*

## 2/Encéphale :

L'encéphale peut être utilisé frais, conservés à +4°C (8 jours maximum) ou congelés à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

- **Préparation de l'encéphale :**

1. Disséquer finement le morceau d'encéphale dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile ou broyer au Mixer Mill l'échantillon dans un tube de 2 ml contenant des billes de 3 mm et de la poussière de billes.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 mg** maximum d'encéphale préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/-1 mg).

*L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **20 mg (maximum) d'encéphale** - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.*

## 3/Muscle cardiaque:

Le muscle cardiaque peut être utilisé frais, conservés à +4°C (8 jours maximum) ou congelés à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

- **Préparation du muscle :**

1. Disséquer finement le morceau de muscle cardiaque dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile ou broyer au Mixer Mill l'échantillon dans un tube de 2 ml contenant des billes de 3 mm et de la poussière de billes.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 mg** maximum de muscle préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/-1 mg).

*L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **20 mg de muscle** - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.*

## V - Extraction de l'ADN

### **Respecter les consignes de manipulations de laboratoire.**

Afin de limiter les risques de contamination inter-échantillon, LSI conseille de :

- espacer au maximum les échantillons lors de l'extraction
- multiplier les contrôles négatifs.

**L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen 51304) OU Nucleospin Tissue de Macherey Nagel (50 ou 250 preps, réf Macherey Nagel : 740952.50 ou 740952.250).**

## 1/ Extraction avec le Kit QIAamp DNA Mini kit de Qiagen

### **Composition du Kit QIAamp DNA mini kit:**

- **QIAamp spin columns:** Conservation à température ambiante: 15-25°C.
- **Collection Tubes (2 ml).**
- **Buffer ATL** <sup>(1)</sup>: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation. Si un précipité s'est formé, chauffer à 70°C jusqu'à dissolution du précipité.
- **Buffer AL** <sup>(1)</sup>: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation. Si un précipité s'est formé, chauffer à 70°C jusqu'à dissolution du précipité.
- **Protéinase K** – Prêt à l'emploi. Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an.
- **Buffer AW1 (Concentré)** <sup>(2)</sup>: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation
- **Buffer AW2 (Concentré)** <sup>(2)</sup>: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation.
- **Buffer AE.** Conservation à température ambiante: 15-25°C.

<sup>(1)</sup> : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

<sup>(2)</sup> : Ajouter la quantité requise d'éthanol à 96-100 % (Volume indiquée sur le flacon) avant la première utilisation.

**Extraction des EPC, NCS et NC :**

- **EPC (External Positive Control)** : dans le Kit TAQVET *Toxoplasma gondii*, l'EPC fourni est de l'antigène. Il est à extraire en même temps que les échantillons. Il sera extrait 1 fois avec le protocole ci dessous. L'ADN obtenu sera à aliquoter et conserver à -20°C.
- **NCS (Contrôle Négatif « Sample »)** : le NCS est à extraire en même temps que les échantillons.
- **NC (Negative Control)** : distribuer directement 25 µl de « Mix Toxo » dans la plaque d'amplification.

**Protocole d'extraction :**

1. Régler un block chauffant ou une étuve à 70°C:
2. Préparation des échantillons :
  - ✚ **Encéphale / muscle cardiaque / Placenta** : Dans un tube Eppendorf :
    - Peser **20 mg de tissu** finement disséqué
    - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
    - Ajouter **20 µl de Protéinase K**
    - Vortexer pendant 1 minute.
  - ✚ **EPC / NCS**: Dans un tube Eppendorf :
    - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
    - Ajouter **20 µl de Protéinase K**
    - Ajouter **200 µl d'EPC ou d'eau pour le NCS**
    - Vortexer pendant 1 minute.
3. Incuber à **70°C** jusqu'à lyse totale (10 à 30 min).
4. Vortexer quelque secondes :  
Ajouter **200 µl de Buffer AL** et vortexer **15 secondes**.
5. Incuber **10 minutes** à **70 °C**.
6. Ajouter **200 µL d'éthanol 100%** - vortexer 15 secondes – centrifuger rapidement.
7. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci. Centrifuger 1 min à 10 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
8. Ajouter **500 µl de Buffer AW1**. Centrifuger 1 min à 10 000 g  
Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
9. Ajouter **500 µl de Buffer AW2**. Centrifuger 1 min à 10 000 g  
Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
10. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 10 000 g.  
(*Séchage de la membrane*)
11. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **200 µl de Buffer AE** pour éluer l'ADN.  
Laisser incuber 1 min puis centrifuger à 6000 g pendant 1 min.

*Stocker l'échantillon obtenu dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C ou à -80°C.*

**2/ Extraction avec le Nucleospin Tissue de Macherey Nagel****Composition du Kit :**

- Nucleospin Tissue columns
- Collection Tubes (2 ml)
- Lysis Buffer T1
- Buffer B1
- Buffer B2
- Wash Buffer BW
- Wash Buffer B5
- Proteinase K lyophilised
- Proteinase Buffer PB

**Préparation des réactifs :**

**Buffer B3 :** Transférer la totalité du tampon B1 dans le tampon B2 et mélanger vigoureusement. Le tampon de lyse B3 ainsi reconstitué est stable pendant 1 an à température ambiante. Une étiquette B3 est fournie dans le kit pour renommer le flacon.

**Tampon de lavage B5 :** ajouter le volume en Ethanol (96-100%) indiqué sur le flacon. Ce tampon de lavage ainsi reconstitué est stable pendant 1 an à température ambiante.

A la première utilisation du kit, ajouter le volume en Tampon PB indiqué sur le flacon à la **Protéinase K** lyophilisée. Cette solution de PK ainsi reconstituée est stable 6 mois à -20°C.

a. Régler une étuve à 70°C:

**b. Préparation des échantillons :**

✚ **Encéphale / muscle cardiaque / Placenta :** Dans un tube Eppendorf :

- Ajouter **180 µL de Buffer T1**
- Ajouter **25 µl de Protéinase K**
- Peser **20 mg d'organe** finement disséqué
- Vortexer pendant 1 minute.

✚ **EPC - NCS :** Dans un tube Eppendorf :

- Ajouter **180 µl de Buffer T1**
- Ajouter **25 µl de Protéinase K**
- Prélever **200 µl d'EPC** ou **d'eau** pour le NCS.
- Vortexer pendant 1 minute.

c. Incuber à **70 °C** 30 min ou **1 nuit à 56°C**

d. Vortexer quelques secondes puis ajouter **200 µl de Buffer B3** et vortexer **15 secondes**.

e. Incuber **10 minutes** à **70 °C**.

f. Ajouter **200 µL d'éthanol 100%** - vortexer 15 secondes – centrifuger rapidement.

g. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.

h. Ajouter **500 µl de Buffer BW**. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.

i. Ajouter **600 µl de Buffer B5**. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.

j. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 11 000 g. (*Séchage de la membrane*)

k. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **200 µl de Buffer BE** pour éluer l'ADN. Laisser incuber 1 min puis centrifuger à 6000 g pendant 1 min.

*Stocker l'échantillon obtenu dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C ou à -80°C.*

**VI - Reconstitution des Mix réactionnels**

**Le « Mix Toxo » est prêt à l'emploi.**

- Agiter le tube de « Mix Toxo » et prélever 20 µl de celui-ci par échantillon à tester dans un tube eppendorf (réaliser cette étape en pièce de mix pour éviter les contaminations du tube initial de « Mix Toxo »).
- Distribuer 20 µl de mix par échantillon à tester dans la microplaque PCR.

**Exemple :**

*400 µl de « Mix Toxo » dans un tube eppendorf pour 19 échantillons à tester (prévoir 1 échantillon en plus pour le volume mort).*



*Ne jamais mélanger des réactifs issus de Kits TaqVet® ayant des numéros de lots différents.*

## VII - Protocole d'amplification

1. Sur le logiciel relié au thermocycleur, créer la plaque suivante :
  - a. Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :

Toxo : Reporter FAM, Quencher : TAMRA.  
IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA

- b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » Toxo et le « Detector » IPC

- c. Réaliser le plan de plaque suivant :

	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo	Mix Toxo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<b>EPC Toxo</b>											
B	<b>NCS</b>											
C	<b>NC</b>											
D												
E												
F												
G												
H												

2. Vortexer le « Mix Toxo » puis centrifuger rapidement avant ouverture.
3. Déposer **20 µL de « Mix Toxo »** dans toutes les cupules de la Microplaque PCR qui seront utilisées pour l'essai.
  - a. **EPC** : Déposer **5 µL d' EPC** (ADN extrait) dans la cupule réservée à l'EPC.
  - b. **Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon ou de NCS** (ADN extrait) dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
  - c. **NC** : Déposer **25 µL de « Mix Toxo »** dans les cupules réservées au NC.
4. Couvrir la plaque avec un Adhesive Cover et placer la plaque dans le thermocycleur. Lancer l'amplification selon le programme suivant :

**Etape 1 : 50°C – 2 minutes – Répétition : 1**

**Etape 2 : 95°C – 10 minutes – Répétition : 1**

**Etape 3 : 95°C – 15 secondes puis 60°C – 1 minute – Répétitions : 45**

5. Interprétation des résultats (cf § VIII ci-dessous)

*Nous sommes à votre disposition pour examiner vos résultats, vous pouvez nous envoyer par email le fichier SDS à l'adresse suivante : [contact@lsivet.com](mailto:contact@lsivet.com)*

## VIII - Interprétation des Résultats

### Validation du test

Contrôler que l' EPC est positif :

Ct EPC Toxo / « Detector » Toxo < 45.  
Ct EPC Toxo / « Detector » IPC > 45.

Contrôler que les Contrôles Négatifs sont négatifs :

Ct NCS surnageants / « Detector » Toxo > 45.  
Ct NCS surnageants / « Detector » IPC > 45.

Ct NC / « Detector » Toxo > 45.  
Ct NC / « Detector » IPC > 45.

### Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » Toxo	« Detector » IPC
Positif Toxo	<b>Ct &lt; 45</b>	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif Toxo	Ct > 45	<b><u>Ct &lt; 45</u></b>
Invalide (a)	Ct > 45	<b>Ct &gt; 45</b>

(a): l'échantillon sera rendu **invalide** (ou à reconstrôler) en raison de la négativité de l'IPC .

### Conduite à tenir pour les échantillons invalides :

1/ Diluer l'ADN de l'échantillon non valide comme indiqué :

⇒ Dilution de l'ADN au 1/10 : 5 µl d'ADN « non valide » + 45 µl d'eau RNase free.

2/ Faire une nouvelle analyse PCR sur 5 µl de cette dilution.

3/ Si l'ADN « non validé » dilué est positif ou négatif en Toxo avec un résultat IPC positif (Ct IPC < 45), le résultat obtenu est alors validé.

4/ Si l'ADN « non validé » dilué est négatif avec un résultat IPC négatif (Ct IPC > ou = 45), le résultat obtenu est toujours non valide. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon « non validé » en le pré-diluant au 1/10 dans de l'eau RNase free avant extraction.