

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™ *Neospora caninum*

Réf : NEOP

Pour la détection de *Neospora caninum* dans

Encéphale

Muscles

Autres tissus susceptibles d'en contenir

Par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel

**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

Patricia GIROUD – Patricia@lsivet.com

Marketing & commercial / Marketing & commercial

Informations commerciales / Commercial Information

Lise GREWIS – lise@lsivet.com

Commandes / Orders

Livraisons / Delivery

Richard GIROUD – Richard@lsivet.com

Informations PCR / PCR Information

Supports Techniques PCR / PCR Technical Information

Sandrine Moine – sandrine@lsivet.com

Mylène Salus – mylene@lsivet.com

Julie Charrot – jcharrot@lsivet.com

Stéphane Daly – sdaly@lsivet.com

Stéphanie Colin – stephanie@lsivet.com

Informations ELISA / ELISA Information

Supports Techniques ELISA / ELISA Technical Information

Julie Meunier – 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™ *Neospora caninum*

Sommaire

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

Kit TaqVet *Neospora caninum*

Pour détection par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel de *Neospora caninum* dans les tissus susceptibles d'en contenir (encéphale, muscles...).

Réf : NEOP

I – Introduction

I.1/ *Neospora Caninum* :

Neospora caninum est un protozoaire (Apicomplexa), proche de *Toxoplasma gondii*, et décrit dans un premier temps comme un parasite du chien responsable de myosite de d'encéphalite.

La néosporose bovine est à présent reconnue comme une cause d'avortement importante chez les bovins, les ovins et les caprins. Les contaminations apparaissent chez les bovins entre 3 et 8 mois de gestation, d'abord au niveau du cerveau et du cœur du fœtus.

Selon Alain JOLY (GDS 56), dans les élevages à avortements répétés, ce protozoaire serait responsable en Bretagne de 20% des cas et **une vache séropositive vis à vis de *Neospora caninum* a 3 fois plus de risques d'avorter** qu'une vache séronégative. Une transmission verticale est constatée dans la majorité des cas : au minimum 80% des veaux issus de vaches séropositives sont contaminés.

Selon diverses études épidémiologiques, les infections à *Neospora caninum* seraient responsables **de 3 à 42 % des avortements en élevage laitier bovin**, lorsque la cause de l'avortement a été identifiée.

LSI recommande pour les laboratoires qui ne sont pas équipés P3 et qui souhaitent réaliser des analyses *Neospora Caninum* d'inactiver les échantillons avant traitement (chauffage minimum à 90°C pendant 30 min).

I.2/ Kit TaqVet *Neospora caninum* :

Chaque échantillon (ADN obtenu après extraction) est analysé en monocupule.

La détection spécifique simultanée de l'ADN du parasite protozoaire et la détection de l'IPC (**I**nternal **P**ositive **C**ontrol) est réalisée en une seule 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 aux cellules bovines.

L'EPC est un ADN. L'EPC ne contient pas la séquence de l'IPC. La détection de l'IPC dans l'EPC ne donnera pas de réponse.

Le kit TaqVet *Neospora caninum* contient :

➤ 1 **mix réactionnel prêt à l'emploi** contenant:

🧪 1 set de Nucléotides *Neospora* :

- 1 Forward Primer
- 1 Reverse Primer
- 1 Sonde *Neospora* – Sonde TaqMan® marquée **FAM** – **Quencher non fluorescent**.

🧪 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 *Neospora*** (External Positive Control) : ADN déjà extrait.

- L'extraction et la purification de l'ADN du parasite protozoaire est réalisée sur colonnes avec le kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen ou avec le kit Nucleospin tissue de Macherey Nagel.
- Le kit TaqVet *Neospora caninum* a été validé et doit être utilisé avec un ABI PRISM® 7000, 7500, 7700 ou 7900 HT (Applied Biosystems). Le kit TaqVet *Neospora Caninum* 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 (Threshold Cycle) obtenus pour chaque échantillon :
 - **Si Ct échantillon < 45**, l'échantillon est positif.
 - **Si Ct échantillon > 45**, l'échantillon est négatif.

II - Réactifs fournis dans le Kit

Le kit TaqVet *Neospora caninum* 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^{ère} utilisation du kit, placer le tube « Mix Neospora » à +4°C. Un kit non utilisé peut-être conservé dans sa globalité (EPC et Mix Neospora) à -20°C.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Code Couleur	Conservation	
			À réception	Après la 1 ^{ère} utilisation
Mix Neospora	2 Tubes de 0,5 mL	Vert	-20°C	+4°C
EPC Neospora	1 Tube de 0,5 mL	Marron	-20°C	-20°C

Mix Neospora: mix réactionnel prêt à l'emploi pour PCR TaqMan® *Neospora caninum*

EPC Neospora : External Positive Control *Neospora* : positif en PCR *Neospora*

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 : Negative 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 : 25 µl de chaque mix Neospora 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 (Qiagen ou Macherey Nagel) :
 - 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 et 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 (servira de **Contrôle Négatif**).
 - o Un bloc chauffant ou étuve pouvant atteindre une température de 70°C.

Pour l'amplification :

- Un thermocycleur avec son consommable : Optical 96-well Reaction Plates 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
Encéphale	25 mg
Muscle	25 mg

1/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 **25 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 25 mg au maximum d'encéphale - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

2/Muscle :

Le muscle 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.
2. Dans un microtube de 1.5 mL, peser **25 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 25 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 (notamment des placenta ou des fœtus) 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).

Extraction des EPC, NCS et NC :

- **EPC (External Positive Control)** : dans le kit TaqVet *Neospora caninum*, l'EPC fourni est de l'ADN.
L' EPC n'est donc pas à extraire.
- **NCS (Contrôle Négatif « Sample »)** : le NCS est à extraire en même temps que les échantillons.
- **NC : Negative Control** : distribuer directement 25 µl de « Mix Neospora » dans la plaque d'amplification.

❖ Extraction avec le Kit QIAamp DNA Mini kit de Qiagen

Composition du kit :

- **QIAamp spin columns:** Conservation à température ambiante: 15-25°C.
- **Collection Tubes (2 ml).**
- **Buffer ATL** ⁽¹⁾: 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** ⁽¹⁾: 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** – Prête à l'emploi. Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an.
- **Buffer AW1 (Concentré)** ⁽²⁾: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation.
- **Buffer AW2 (Concentré)** ⁽²⁾: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation.
- **Buffer AE** : Conservation à température ambiante: 15-25°C.

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

⁽²⁾ : Ajouter la quantité requise d'éthanol à 96-100 % (volume indiqué sur le flacon) avant la première utilisation.

Protocole d'extraction :

1. Régler un block chauffant ou une étuve à 70°C.
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Encéphale / muscle cardiaque** : dans un tube Eppendorf :
 - Peser **25 mg de tissu** finement disséqué
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
 - Ajouter **20 µl de Protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
3. Incuber à **70°C** jusqu'à lyse totale (10 à 30 min).
4. Vortexer quelques 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.

❖ 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.

Protocole d'extraction :

1. Régler une étuve à 70°C.
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Encéphale / muscle cardiaque** : dans un tube Eppendorf :
 - Peser **25 mg de tissu** finement disséqué
 - Ajouter **180 µL de Buffer T1**
 - Ajouter **25 µl de Protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
3. Incuber à **70°C** 30 min ou **1 nuit à 56°C**.
4. Vortexer quelques secondes.
Ajouter **200 µl de Buffer B3** 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 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
8. Ajouter **500 µl de Buffer BW**. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
9. Ajouter **600 µl de Buffer B5**. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
10. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 11 000 g. (*Séchage de la membrane*)
11. 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 Neospora » est prêt à l'emploi.

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

Exemple :

400 µl de « Mix Neospora » 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. Prendre une microplaque et un Adhesive Cover et créer le plan de plaque.
 - a. Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :
 - Neospora : Reporter FAM, Quencher : BHQ (indiquer « none »).
 - IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA.
 - b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » NEO et le « Detector » IPC.
 - c. Réaliser le plan de plaque suivant :

	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo	Mix Neo
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC Neo											
B	NCS											
C	NC											
D	Ech. 1											
E												
F												
G												
H												

2. Vortexer le « Mix Neospora » puis centrifuger rapidement avant ouverture. Distribuer le mix dans chaque cupule : test en monocupule.
3. Déposer **20 µL de « Mix Neospora »** dans toutes les cupules de la microplaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - a. **EPC** : déposer **5 µL d'ADN 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 microplaque qui seront utilisées pour l'essai.
- c. **NC**: Déposer **20 µl de « Mix Neospora »** dans la cupule réservée au NC.
4. Couvrir la microplaque avec un Adhesive Cover et la placer dans le thermocycleur.
5. 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

Interprétation des résultats (cf § VIII ci-dessous)

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

VIII - Interprétation des résultats

Validation du test

Contrôler que l' EPC (Mix Neospora) est positif :

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

Contrôler que les Contrôles Négatifs (Neospora et IPC) sont négatifs :

Ct NCS / « Detector » IPC > 45.
Ct NCS / « Detector » Neospora > 45.

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

Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » Neospora	« Detector » IPC
Positif Neospora	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif Neospora	Ct > 45	Ct < 45
Non validé (*)	Ct > 45	<u>Ct > 45</u>

(*): l'échantillon sera rendu **non validé** (ou à recontrôler) en raison de la négativité de l'IPC.

Conduite à tenir pour les échantillons non validés :

- Diluer au 1/10 les ADN inhibés et les repasser en PCR *Neospora caninum*. La sortie de l'IPC dans les ADN au 1/10 validera le test.