

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.

PCR
PCR

TaqMan
TaqMan

Attention
modifications du kit

Coffret unique à -20°C à réception

ATTENTION le Mix MPTSA est à reconstituer

Kit TaqVet™ *M. paratuberculosis* Advanced

Réf : MPTSA

Pour détection de *Mycobacterium paratuberculosis*
dans :

Fèces

Bouillon de culture (issu du système automatisé de culture des mycobactéries «Trek »)

Organes (Valvule Iléo-caecale ou ganglion mésentérique)

Colonies

par utilisation de sondes TaqMan®
en PCR temps réel



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
Support Techniques PCR / PCR Technical Information
Sandrine Moine (responsable du service PCR) – sandrine@lsivet.com
Mylène Salus (responsable production) – mylene@lsivet.com
Julie Charrot – jcharrot@lsivet.com
Stéphane Daly (pour informations TREK) – sdaly@lsivet.com
Stéphanie Colin (pour informations SLAN) – stephanie@lsivet.com

Informations ELISA / ELISA Information
Support Techniques ELISA / ELISA Technical Information
Laura Fournier – laura@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 *M. paratuberculosis* Advanced

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Composition et conditionnement du Kit	5
III. Matériel et réactifs non fournis et recommandés	6
IV. Les échantillons	7
V. Les différents types d'extraction	8
VI. Extraction de l'ADN de <i>M. paratuberculosis</i> sans broyage	9
1/ Extraction en colonne : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies	9
1.1/ Kits utilisés	9
1.2/ Témoins positifs et négatifs	9
1.3/ Protocole d'extraction colonne sans broyage	9
2/ Extraction en plaque : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies	13
2.1/ Kit utilisé	13
2.2/ Témoins positifs et négatifs	13
2.3/ Protocole d'extraction en plaque sans broyage	13
VII. Extraction de l'ADN de <i>M. paratuberculosis</i> avec broyage	15
1/ Extraction en colonne : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies	15
1.1/ Kits utilisés	15
1.2/ Témoins positifs et négatifs	15
1.3/ Protocole d'extraction colonne avec broyage	15
2/ Extraction en plaque : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies	19
2.1/ Kits utilisés	19
2.2/ Témoins positifs et négatifs	19
2.3/ Protocole d'extraction en plaque avec broyage	19
VIII. Reconstitution du Mix réactionnel	23
IX. Protocole d'amplification	23
X. Interprétation des résultats	24

Kit TAQVET *M. paratuberculosis* Advanced

Pour la détection de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les fèces, les organes, le bouillon de culture et les colonies par utilisation de sondes Taqman® en PCR temps réel

Réf : MPTSA

I – Introduction

Le Kit TAQVET *M. paratuberculosis* Advanced pour la détection du *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Mycobacterium paratuberculosis*) a été développé par LSI et permet la détection de la séquence d'insertion IS900, spécifique de *M. paratuberculosis*, à partir de fèces et de colonies.

Le séquence IS900 est répétée entre 14 et 18 fois sur le génome de *M. paratuberculosis* et fait partie de la famille des séquences d'insertion IS110 (Tableau 1).

Famille des séquences d'insertion	IS110					
	IS900	IS901	IS902	IS1110	IS1547	IS1626
Séquences						
Mycobactéries	<i>M. paratuberculosis</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. silvaticum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i>
% Homologie / IS900	100	73	73	74	NS	82

Tableau 1 – Comparaison des séquences d'insertion de la famille IS110

NS : Non significatif

La séquence IS900, spécifique de *M. paratuberculosis* est voisine de la séquence IS1626 spécifique de *M. intracellulare* et de *M. avium* (82% d'homologie). Afin d'éviter un risque de faux positifs (détection de souches de *M. avium* ou *M. intracellulare*), le Kit TAQVET *M. paratuberculosis* Advanced utilise des primers et une sonde Taqman spécifiques de l'IS900 choisies dans des régions où la variabilité des séquences est maximale entre IS900 et IS1626 (Région V, Cf Tableau 2).

--	--	--	--	--	--	--

Tableau 2 : Comparaison des séquences IS900 - IS1626 avec alignement des primers et sonde du Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced*.

C : Partie constante entre IS900 et IS1626
V : Partie variable entre IS900 et IS1626
n : Nucléotide commun , N : Nucléotide variable (mismatch)
En noir : Séquences variables IS900 et IS1626

Dans le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced*, chaque échantillon (ADN obtenu après extraction) est analysé en monocupule: la même cupule est utilisée pour la détection spécifique de l'ADN bactérien de *M. paratuberculosis* et pour la détection de l'IPC (Internal Positive Control). La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons.

II – Composition et conditionnement du kit

1/ Composition du kit

Le Kit TaqVet *M. paratuberculosis Advanced* contient :

- **un Mix (Seq MPTSA)** contenant :
 - ✚ 1 Set de Nucléotides spécifique de *M. paratuberculosis* :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde *M. paratuberculosis* – Sonde Taqman® marquée FAM - Mgb.
 - ✚ 1 Set de Nucléotides spécifique de l'IPC :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IPC – Sonde Taqman® marquée VIC-Tamra.
- **1 IPC** (Internal Positive Control). Lors de la première utilisation, faire des aliquots de 25 µl pour éviter plusieurs cycles de décongélation.
- **1 EPC MPTSA** (External Positive Control *M. paratuberculosis* : Positif en qPCR *M. paratuberculosis*).
- 1 Flaçon de **Master Mix** pour qPCR Taqman ADN.
- **300 billes de verre.**
- 1 Sachet de **100 tubes** et bouchons de 10 ml.
- L'extraction et la purification de l'ADN bactérien sont réalisées :
 - ✚ **sur Colonnes** : avec le Kit QIAamp DNA Mini Kit (Réf Qiagen 51304 ou 51306), le Buffer ASL (Réf Qiagen 19082) et le kit QIAshredder (Réf Qiagen 79654 ou 79656) ou le kit Nucleospin Tissue (50 ou 250 preps, réf Macherey Nagel : 740952.50 ou 740952.250).
 - ✚ **sur Plaques** : avec le Kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot (Réf Qiagen 965842), le Buffer ASL (Réf Qiagen 19082) et le kit QIAshredder (Réf Qiagen 79654 ou 79656) ou le kit Nucleospin 96 Tissue (2, 4 ou 24 x 96 preps, réf Macherey Nagel : 740741.2, 740741.4 ou 740741.24).
- Le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced* a été validé et doit être utilisé avec un ABIPRISM® 7000, 7300, 7500 ou avec un ABIPRISM® 7700 ou 7900 HT (Applied Biosystems). Le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced* 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. Pour des échantillons de même nature, plus le Ct est faible, plus la charge bactérienne contenue dans l'échantillon est importante.
 - **Si Ct échantillon > 45**, l'échantillon est négatif.

2 - Réactifs fournis dans le Kit

Le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced* se présente sous la forme d'un UNIQUE coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 100 tests en monocupule. Suite à la 1^{ère} utilisation du kit, placer le tube « Mix EMM » à +4°C. Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Code Couleur	Conservation	
			À réception	Après la 1 ^{ère} utilisation
Master Mix	2 Tubes de 2 mL	VertBlanc	-20°C	+4°C
SEQ MPTSA	1 Tube de 0,5 mL	BleuVert	-20°C	-20°C
EPC MPTSA	1 Tube de 2 mL	VioletBleu	-20°C	-20°C
IPC	1 Tube de 0,5 ml	Jaune	-20°C	-20°C
Tubes, billes et bouchons	Sachet	T° ambiante	/	/

Attention : Le Contrôle Négatif utilisé dans la réaction n'est pas fourni dans le Kit. LSI recommande d'utiliser de l'eau DNase Free.

2 types de Contrôle Négatif peuvent être utilisés :

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

2/ NC : Negative Control : 20 µl de « Mix *M. paratuberculosis Advanced* » dans la plaque d'amplification (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate). Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

III - Matériel et réactifs non fournis et recommandés

1/ Pour l'amplification :

- Un ABI PRISM SDS 7000 (Applied Biosystems) ou compatible avec son consommable : MicroAmp Optical 96-well Reaction Plates et Adhesive Covers.

2/ Pour l'extraction d'ADN en colonne

- Si extraction sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA Mini kit (Réf Qiagen : 51304 ou 51306) ou le Kit QIAamp DNA Stool (Réf Qiagen : 51454) :
 - 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 free de 1,5mL (type Eppendorf ou équivalent)
 - o Tubes collecteurs de 2mL
 - o Ethanol 100%
 - o Eau Rnase free (DEPC-H₂O) qui servira de **Contrôle Négatif**
 - o Une étuve ou un bain-marie pouvant atteindre une température de 70°C

Si extraction sans broyeur :

- Kit Qias shredder spin column QIAGEN (Réf Qiagen : 79654 ou 79656)
- Buffer ASL (Réf Qiagen : 19082)
- Un bloc chauffant pouvant atteindre une température de 95°C

Si extraction avec broyeur :

- Un broyeur de type Tissue Lyser (Réf Qiagen : 85220)
- Adaptateurs colonnes : Tissue Lyser adaptater set 2x24 (Réf Qiagen : 69982)
- Adaptateurs plaques : Tissue Lyser adaptater set 2x96 (Réf Qiagen : 69984)
- Billes pré-distribuées en tube 2x24 (Réf LSI : BPC)
- Billes pré-distribuées en plaque (2x96 Collection Microtubes) (Réf LSI : BPP)

3/ Pour l'extraction d'ADN en plaque :

- Si extraction sur plaques avec le Kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot (Ref Qiagen : 965842)
 - o Une centrifugeuse SIGMA 4-15C ou 4K-15C avec plate Rotor 2*96
 - 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 free de 1,5mL (type Eppendorf ou équivalent)
 - o Ethanol 100%
 - o Eau Rnase free (DEPC-H₂O) qui servira de **Contrôle Négatif**
 - o Une étuve ou un bain-marie pouvant atteindre une température de 70°C

Si extraction sans broyeur :

- Kit Qias shredder spin column QIAGEN (Réf Qiagen : 79654 ou 79656)
- Buffer ASL (Réf Qiagen : 19082)
- Un bloc chauffant pouvant atteindre une température de 95°C.

Si extraction avec broyeur :

- Un broyeur de type Tissue Lyser (Réf Qiagen : 85220)
- Adaptateurs colonnes : Tissue Lyser adaptater set 2x24 (Réf Qiagen : 69982)
- Adaptateurs plaques : Tissue Lyser adaptater set 2x96 (Réf Qiagen : 69984)
- Billes pré-distribuées en collection tube 2X24 (réf. LSI : BPC)
- Billes pré-distribuées en plaque (2x96 collection microtubes) (réf. LSI : BPP)

4/ Pour les manipulations :

- Gants latex **non poudrés**.

IV – Les échantillons

Numéroter ou identifier les tubes ou les microtubes qui vont contenir les échantillons ou les extraits.

Les prélèvements

Type échantillon	Matériel de prélèvement
Fèces	Au moins 1 gramme de fèces dans un pot à fèces
Organes	Valvule Iléo-cæcale ou ganglion mésentérique
Bouillon de culture issu de la culture en Trek*	500µL de bouillon de culture Trek*
Colonies sur gélose	Prélever les colonies (2 ou 3 colonies) avec une anse stérile et resuspendre dans 500 µL d'eau DNase free

* **TREK** : Système automatisé de culture des mycobactéries (voir auprès de LSI pour tout renseignement).

1 / Fèces

Les fèces sont utilisables frais, conservés à +4°C (8 jours maximum) ou congelés à -20°C (1 an maximum). L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir d' 1 gramme de fèces avec le Kit QIAamp DNA Mini kit (Réf 51304) ou le Kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot (Réf Qiagen : 965842). Réaliser l'extraction de l'ADN (Cf Chapitre VI).

2/ Colonies sur gélose

Dans un tube Eppendorf, reprendre 2 à 3 colonies dans 500 µl d'eau DNase RNase free ou équivalent. Vortexer quelques secondes. Cette suspension peut être conservé à +4°C, et le transport est possible, toujours à +4°C. Réaliser l'extraction de l'ADN (Cf Chapitre VI).

3/ Culture Trek*

Prélever 500µL de culture Trek après agitation (au vortex 1 à 2 minutes pour resuspendre la culture dans le milieu). Cette suspension peut être conservée et transportée à +4°C. Réaliser l'extraction de l'ADN (Cf Chapitre VI).

* Contacter LSI pour tout renseignement sur le système de culture Trek.

4/ Organes :

Après le prélèvement d'un organe, il existe 2 traitements :

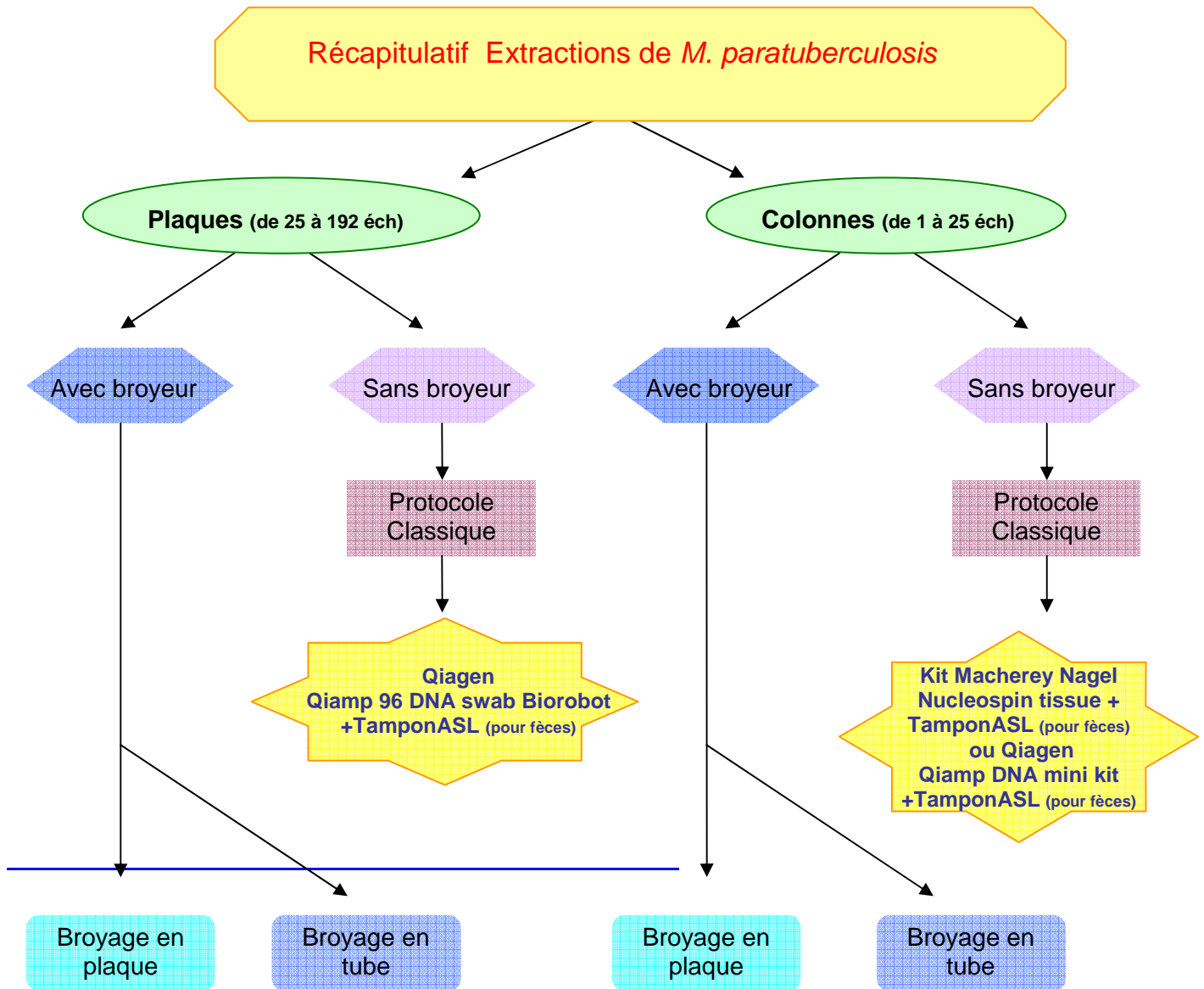
1/ L'organe est prélevé à proximité du laboratoire PCR (Salle d'autopsie par exemple), deux procédures sont ensuite possibles :

- soit réaliser l'extraction de l'ADN immédiatement.
- soit congeler les morceaux découpés à -20°C.

2/ L'organe est prélevé à distance du laboratoire réalisant les analyses PCR, il est conseillé :

- soit de faire voyager l'organe à +4°C (Transport < 24 heures).
- soit de congeler l'organe (Transport > 24 Heures). Les morceaux de 30 mg seront préparés à partir de l'organe décongelé.

V – Les différents types d'extraction



VI - Extraction de l'ADN de M. paratuberculosis sans broyage



- Réaliser les extractions avec :
- ✚ le kit QIAamp DNA Mini kit (Réf : 51304 ou 51306)
 - ✚ le Kit QIAamp DNA Stool (Réf : 51454)
 - ✚ le kit Nucleospin Tissue (Réf : 740952.50 ou 740952.250)

Attention, quel que soit le kit utilisé (Qiagen ou Macherey Nagel), il est nécessaire de prévoir :

- ✚ Buffer Nucleospin tissue (1 échantillon) (Réf Qiagen: 19082) : Cf 3.
- ✚ des colonnes QIAamp (1 colonne / échantillon) (Réf : 79654 ou 79650) : Cf 4.

Le Kit QIAamp DNA Biorobot contient du Buffer ASL mais il faut en prévoir en excès car la quantité fournie n'est pas suffisante compte tenu des volumes utilisés pour l'extraction de *M. paratuberculosis*.
Le Kit Nucleospin tissue ne contient pas de buffer ASL.

Les kits et leurs composants sont à conserver à température ambiante (15-25°C).

1.2/ Témoins positifs et négatifs

EPC : Commencer l'extraction à l'étape 3d: Dans le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced* (MPTSA), l'EPC est à extraire en même temps que les échantillons.

L'ADN extrait doit être ensuite aliquoté et conservé à -20°C.

NCS (Contrôle Négatif « Sample ») : Commencer l'extraction à l'étape 3d:

Pour réaliser ce témoin de validation d'extraction, extraire 200 µl d'eau DNase RNase free au cours de l'extraction des échantillons.

NC : Negative Control : il permet de contrôler la « propreté » du mix reconstitué.

Distribuer directement 25 µl de « Mix *M. paratuberculosis Advanced* » dans la plaque d'amplification.

1.3/ Protocole d'extraction colonne sans broyage

1.3.1/ Extraction avec le Kit QIAamp DNA

1. Régler un **block chauffant sur 95°C**.
2. Préparation des échantillons :
 - a. **Fèces :** Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :
 - peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés, prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
 - ajouter **5 mL de Buffer ASL**
 - ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit)
 - Vortexer 1 minute
 - Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 700 µl** dans une colonne **QIAshredder** (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
 - Centrifuger **2 min à 15 000 g**.
 - Jeter la colonne et **garder le tube collecteur**. Le boucher à l'aide des bouchons fournis dans le kit **QIAshredder**
 - **Vortexer** quelques secondes.
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.
 - b. **Organes :** Dans un tube Eppendorf :
 - peser **30 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
 - ajouter **180 µL de Buffer ATL**
 - **20 µl de protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - **Incuber à 70°C** pendant **30 min** ou **toute la nuit** (16 à 18 h) **à 56°C**.
 - c. **Bouillon de culture Trek :** Dans un tube Eppendorf
 - Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**
 - Vortexer 1 minute
 - Incuber **10 min à 95 °C** dans le bloc chauffant.
 - d. **Colonies en suspension:** Dans un tube Eppendorf :
 - Prélever **2 à 3 colonies**
 - Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
 - Vortexer 1 minute
 - Incuber **10 min à 95 °C** dans le bloc chauffant.
3. Attendre que les tubes refroidissent et **vortexer quelques secondes :**
 - a. Pour les **fèces** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer AL**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon** (contenu dans le tube collecteur de la QIAshredder)
 - **Vortexer 15 secondes**

Conserver jusqu'à la fin de l'essai, le contenu du tube collecteur QIAshredder de chaque échantillon extrait.

- b. Pour les **organes :**
 - Reprendre le tube contenant le morceau d'organe dans le tampon **ATL**.
 - Ajouter **200 µl de Buffer AL**

- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **Vortexer 15 secondes**
- **Incuber à 70°C** pendant **10 min**

Reprendre l'extraction au point n°5.

c. Pour les **colonies et le bouillon de culture Trek**, mettre dans le tube Eppendorf :

- **200 µl de Buffer AL.**
- **20 µl de protéinase K**
- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **200 µl de suspension**
- **Vortexer 15 secondes**

d. Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans un tube Eppendorf :

- **200 µl de Buffer AL.**
- **20 µl de protéinase K**
- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
- **Vortexer 15 secondes**

4. **Incuber à 70°C** pendant **30 min** ou **toute la nuit** (16 à 18 h) à **56°C**.
5. Attendre que les tubes refroidissent, ajouter dans le tube Eppendorf, **200 µl d'éthanol** à 100%, et vortexer quelques secondes.
6. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci. **Centrifuger 1 min** à vitesse maximale (15 000 à 20 000 g). Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
7. Ajouter **500 µl de Buffer AW1**. **Centrifuger 1 min** à vitesse maximum (15 000 à 20 000 g). Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
8. Ajouter **500 µl de Buffer AW2**. **Centrifuger 1 min** à vitesse max (15 000 à 20 000 g). Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
9. Poser la colonne sur un nouveau tube collecteur et **centrifuger 3 min à vitesse maximale** (15 000 à 20 000 g). (*Séchage de la membrane*)
10. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **100 µl de Buffer AE*** pour éluer l'ADN. Laisser **incuber 1 min** puis **centrifuger à vitesse maximum pendant 1 min** (15 000 à 20 000 g).
11. 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

1.3.2/ Extraction avec le Nucleospin Tissue

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.

1. Régler un **block chauffant sur 95°C**.
2. Préparation des échantillons :
 - a. **Fèces** : Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :
 - peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés, prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
 - ajouter **5 mL de Buffer ASL**
 - ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit)
 - Vortexer 1 minute
 - Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 700 µl** dans une colonne **QIAshredder** (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
 - Centrifuger **2 min à 15 000 g**.
 - Jeter la colonne et **garder le tube collecteur**. Le boucher à l'aide des bouchons fournis dans le kit **QIAshredder**
 - **Vortexer** quelques secondes.
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.
 - b. **Organes** : Dans un tube Eppendorf :
 - peser **30 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
 - ajouter **180 µL de Buffer T1**
 - **25 µl de protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - **Incuber à 70°C pendant 30 min ou toute la nuit (16 à 18 h) à 56°C**.
 - c. **Bouillon de culture Trek** : Dans un tube Eppendorf
 - Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**
 - Vortexer 1 minute
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.
 - d. **Colonies en suspension** : Dans un tube Eppendorf :
 - Prélever **2 à 3 colonies**
 - Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
 - Vortexer 1 minute
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.

3. Attendre que les tubes refroidissent et **vortexer quelques secondes** :

- Pour les **fèces** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer B3**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon** (contenu dans le tube collecteur de la QIAshredder)
 - **Vortexer 15 secondes**

Conserver jusqu'à la fin de l'essai, le contenu du tube collecteur QIAshredder de chaque échantillon extrait.

- Pour les **organes** :
 - Reprendre le tube contenant le morceau d'organe dans le tampon **T1**
 - Ajouter **200 µl de Buffer B3**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **Vortexer 15 secondes**
 - **Incuber à 70°C pendant 10 min**

Reprendre l'extraction au point n°5.

- Pour les **colonies et le bouillon de culture Trek**, mettre dans le tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer B3**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)

- **200 µl de suspension**
 - **Vortexer 15 secondes**
- Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans un tube Eppendorf :
- **200 µl de Buffer B3.**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
 - **Vortexer 15 secondes**
4. **Incuber à 70°C** pendant **30 min** ou **toute la nuit** (16 à 18 h) **à 56°C.**
 5. Attendre que les tubes refroidissent, ajouter dans le tube Eppendorf, **200 µl d'éthanol** à 100%, et vortexer quelques secondes.
 6. **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.**
 7. Ajouter **500 µl de Buffer BW.** **Centrifuger 1 min** à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne.**
 8. Ajouter **600 µl de Buffer B5.** **Centrifuger 1 min** à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne.**
 9. Poser la colonne sur un nouveau tube collecteur et **centrifuger 3 min** à 11 000 g. (*Séchage de la membrane*)
 10. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **100 µl de Buffer BE*** pour éluer l'ADN. Laisser **incuber 1 min** puis **centrifuger** à 11 000 g.
 11. 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

2/ Extractions en plaque : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies

2.1/ Kit utilisé

Réaliser les extractions avec :

- 🔧 le kit **kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot** (Réf : 965842).

Attention, quelque soit le Kit utilisé (Qiagen ou Macherey Nagel), il est nécessaire de prévoir :

- 🔧 Buffer ASL de Qiagen (5 ml / échantillon) (Réf Qiagen: 19082) : Cf 3.
- 🔧 Les colonnes QIAshredder (1 colonne / échantillon) (Réf : 79654 ou 79656) : Cf 4.

Les colonnes QIAshredder (Réf : 79654 ou 79656) et **le Buffer ASL** (ref Qiagen : 19082) ne sont pas fournis dans le kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot, il vous faut les commander chez Qiagen parallèlement votre kit d'extraction.

3 S-blocks sont utilisés par extraction. Les S-Blocks sont réutilisables après nettoyage et décontamination : rinçage avec de l'eau distillée, trempage 1 minute à température ambiante dans une solution à 0,4 M HCl, vidage, et nouveau rinçage en eau distillée. Les S-Blocks sont également autoclavables après lavage.

Le Kit et ses composants sont à conserver à température ambiante (15-25°C).

2.2/ Témoins positifs et négatifs

EPC : Commencer l'extraction à l'étape 3d : dans le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced*, l'EPC est à extraire en même temps que les échantillons.

L'ADN extrait doit être ensuite aliquoté et conservé à -20°C.

NCS (Contrôle Négatif « Sample ») : commencer l'extraction à l'étape 3d:

Pour réaliser ce témoin de validation d'extraction, extraire 200 µl d'eau DNase RNase free au cours de l'extraction des échantillons.

NC : Negative Control : il permet de contrôler la « propreté » du mix reconstitué.

Distribuer directement 25 µl de « Mix *M. paratuberculosis Advanced* » dans la plaque d'amplification.

2.3/ Protocole d'extraction plaque sans broyage : kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot

- Régler un bloc chauffant à 95°C
- Préparation des échantillons :
 - Fèces** : Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :
 - Peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés, prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
 - Ajouter **5 mL de Buffer ASL**
 - Ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit)
 - Vortexer 1 minute
 - Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 700 µl** dans une colonne **QIAshredder** (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
 - Centrifuger **2 min à 15 000 g**.
 - Jeter la colonne et **garder le tube collecteur**. Le boucher à l'aide des bouchons fournis dans le kit **QIAshredder**
 - **Vortexer** quelques secondes
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.
 - Organes** : Dans un tube Eppendorf :
 - Peser **30 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
 - **20 µl de protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - **Incuber à 70°C** pendant **30 min** ou **toute la nuit** (16 à 18 h) **à 56°C**.
 - Bouillon de culture Trek** : Dans un tube Eppendorf
 - Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**
 - Vortexer 1 minute
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.

- d. **Colonies en suspension**: Dans un tube Eppendorf :
- Prélever **2 à 3 colonies**
 - Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
 - Vortexer 1 minute
 - Incuber **10 min à 95°C** dans le bloc chauffant.

3. Attendre que les tubes refroidissent et **vortexer quelques secondes**.

- a. Pour les **fèces** mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**):
- **200 µl de Buffer AL**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon** (contenu dans le tube collecteur de la QIAshredder)
 - **Vortexer 15 secondes**

Conserver jusqu'à la fin de l'essai, le contenu du tube collecteur QIAshredder de chaque échantillon extrait.

- b. Pour les **organes** mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**):
- **200 µl de Buffer AL**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon en tampon ATL**
 - **Vortexer 15 secondes**
 - Filmer la plaque et **incuber à 70°C** pendant **10 min** (à l'étuve)

Reprendre l'extraction au point n°5.

- c. Pour les **colonies et le bouillon de culture Trek**, mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**):
- **200 µl de Buffer AL**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl de suspension**
 - **Vortexer 15 secondes**
- d. Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**):
- **200 µl de Buffer AL**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
 - **Vortexer 15 secondes**

4. Filmer la plaque et **incuber à 70°C** pendant **30 min** (à l'étuve) ou **toute la nuit** (16 à 18 h) **à 56°C**.

5. Attendre que le bloc refroidisse, ajouter dans chaque puits, **200 µl d'éthanol à 100%**.

6. Prendre un **plaque QIAamp-96** et placer la sur un nouveau S-Block (**S-Block 2**). Transférer les échantillons du S-Block **1** dans la plaque QIAamp-96 en respectant le plan de plaque. **Couvrir** la plaque QIAamp-96 avec un adhésif Air Pore Tape Shit. **Centrifuger 4min à 6 000g**.

7. Distribuer **500 µl** de **Buffer AW1** dans chaque puits de la plaque QIAamp-96. Couvrir la plaque QIAamp-96 avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6 000 g**.

8. Placer la **plaque** QIAamp-96 sur un nouveau S-Block (S-Block **3**).

9. Distribuer **500 µl** de **Buffer AW2** dans chaque puits de la plaque QIAamp 96. Couvrir la plaque QIAamp-96 avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6 000 g**.

10. **Centrifuger** 10 min à 6000 g. Garder le S-block (S-Block **3**) - (*Séchage de la membrane*)

11. Placer la plaque QIAamp-96 sur **une boîte de tubes collecteurs** (Microtubes pour Elution CL).

12. Distribuer **100 µl** de **Buffer AE*** dans chaque puits de la **plaque** QIAamp-96. **Incuber 2 min** à t° ambiante.

13. **Centrifuger 3 min à 6 000 g** (*avec adhésif*) – retirer la plaque QIAamp 96– boucher les tubes.

Stocker l'échantillon obtenu (ADN) 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

VII – Extraction de l'ADN de *M. paratuberculosis* avec broyage

1/ Extractions en colonne : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies

1.1/ Kits et matériel utilisés

Réaliser les extractions avec :

- ✚ le kit QIAamp DNA Mini kit (Réf : 51304 ou 51306)
- ✚ le Kit QIAamp DNA Stool (Réf : 51454)
- ✚ le kit Nucleospin Tissue (Réf : 740952.50 ou 740952.250)

Pour le broyage :

- ✚ Billes pré-distribuées en tube 2X24 (réf. LSI : BPC)
- ✚ Billes pré-distribuées en plaque (2x96 collection microtubes) (réf. LSI : BPP)
- ✚ Broyeur type Tissue Lyser (réf. 85220)
- ✚ Adaptateur Plaques 2X96 (réf. 69984)
- ✚ Adaptateur Tubes 2X24 (réf. 69982)

1.2/ Témoins positifs et négatifs

EPC : Commencer l'extraction à l'étape 5d : dans le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced*, l'EPC est à extraire en même temps que les échantillons.

L'ADN extrait doit être ensuite aliquoté et conservé à -20°C.

NCS (Contrôle Négatif « Sample ») : commencer l'extraction à l'étape 5d:

Pour réaliser ce témoin de validation d'extraction, extraire 200 µl d'eau DNase RNase free au cours de l'extraction des échantillons.

NC : Negative Control : il permet de contrôler la « propreté » du mix reconstitué.

Distribuer directement 25 µl de « Mix *M. paratuberculosis Advanced* » dans la plaque d'amplification.

1.3/ Protocole d'extraction colonne avec broyage

1.3.1/ Extraction avec Qiamp DNA Stool

1. Préparation des échantillons :

Fèces : Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :

- Peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
- Ajouter **4 mL d'eau distillée stérile**
- Ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit)
- Vortexer 1 minute

Organes : Dans un tube Eppendorf :

- Peser **40 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
- Ajouter **500 µL d'eau**
- Vortexer pendant 1 minute.

Bouillon de culture Trek : Dans un tube Eppendorf

- Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**

Colonies : Dans un tube Eppendorf :

- Prélever **2 à 3 colonies**
- Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
- Vortexer 1 minute.

2. Broyage en tube individuel :

- **Fèces** : Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 1000 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes.

- **Organes** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes.
- **Colonies en suspension** ou **bouillon de culture Trek**: **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes.

Ou broyage en plaque :

- **Fèces** : Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 900 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
 - **Organes** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.
 - **Colonies en suspension** ou **bouillon de culture Trek**: **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.
3. **Agiter** les tubes de broyage ou les collection microtubes à l'aide d'un broyeur 2 x 5 min à 30p/sec (retourner le sens des boites entre les deux séries de 5 min pour un broyage homogène)
 4. **Centrifuger** les tubes **1 min** à 6000g.
 5. **Lyse des échantillons** :
 - a. Pour les **fèces** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer AL.**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon**
 - **Vortexer 15 secondes.**
 - b. Pour les **organes** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **180 µl de Buffer ATL.**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon broyé**
 - **Vortexer 15 secondes.**
 - **Incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**
 - Ajouter **200 µl de Buffer AL**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - **Incuber à 70°C pendant 10 min**

Reprendre l'extraction au point n°7.
 - c. Pour les **colonies** ou le **bouillon de culture Trek** mettre dans le tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer AL.**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl de suspension après broyage**
 - **Vortexer 15 secondes.**
 - d. Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer AL.**
 - **20 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
 - **Vortexer 15 secondes**
 6. **Incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**
 7. **Ajouter 200 µl d'éthanol à 100%**, et vortexer quelques secondes. Centrifuger rapidement les tubes.
 8. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci. **Centrifuger 1 min** à vitesse maximale (15 000 à 20 000 g). Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne.**
 9. Ajouter **500 µl de Buffer AW1.** **Centrifuger 1 min** à vitesse maximum (15 000 à 20 000 g). Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne.**

10. Ajouter **500 µl de Buffer AW2. Centrifuger 1 min** à vitesse max (15 000 à 20 000 g).
Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne.**
11. Poser la colonne sur un nouveau tube collecteur et **centrifuger 3 min** à vitesse maximale (15 000 à 20 000 g).
(*Séchage de la membrane*)
12. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **100 µl de Buffer AE*** pour éluer l'ADN.
Laisser **incuber 1 min** puis **centrifuger à vitesse maximum pendant 1 min** (15 000 à 20 000 g).
13. 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

1.3.2/ Extraction avec le Nucleospin Tissue

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.

1. Préparation des échantillons :

Fèces : Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :

- Peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
- Ajouter **4 mL d'eau distillée stérile**
- Ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit)
- Vortexer 1 minute

Organes : Dans un tube Eppendorf :

- Peser **40 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
- Ajouter **500 µL d'eau**
- Vortexer pendant 1 minute.

Bouillon de culture Trek : Dans un tube Eppendorf

- Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**

Colonies : Dans un tube Eppendorf :

- Prélever **2 à 3 colonies**
- Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
- Vortexer 1 minute.

2. Broyage en tube individuel :

- **Fèces :** Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 1000 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes.
- **Organes :** **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes.

- **Colonies en suspension** ou **bouillon de culture Trek**: **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes.

Ou broyage en plaque :

- **Fèces** : Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 900 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Organes** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.
- **Colonies en suspension** ou **bouillon de culture Trek**: **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.

3. Agiter les tubes de broyage ou les collection microtubes à l'aide d'un broyeur 2 x 5 min à 30p/sec (retourner le sens des boites entre les deux séries de 5 min pour un broyage homogène).

4. Centrifuger les tubes **1 min** à 6000g.

5. Lyse des échantillons :

- Pour les **fèces** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer B3**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon**
 - **Vortexer 15 secondes.**
- Pour les **organes** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **180 µl de Buffer T1.**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon broyé**
 - **Vortexer 15 secondes.**
 - **Incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**
 - Ajouter **200 µL de Buffer B3**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - **Incuber à 70°C** pendant **10 min** puis Reprendre l'extraction au point n°7
- Pour les **colonies** ou le **bouillon de culture Trek** mettre dans le tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer B3**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl de suspension après broyage**
 - **Vortexer 15 secondes.**
- Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans un tube Eppendorf :
 - **200 µl de Buffer B3**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
 - **Vortexer 15 secondes**

6. Incuber 30 min à 70°C à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**

7. Ajouter 200 µl d'éthanol à 100%, et vortexer vigoureusement quelques secondes. Centrifuger rapidement les tubes.

8. Identifier des colonnes et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci. **Centrifuger 1 min** à 11000g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne.**

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

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

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

12. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **100 µl de Buffer BE*** pour éluer l'ADN. Laisser **incuber 1 min** puis **centrifuger à 11 000 g pendant 1 min.**

13. 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

2/ Extractions en plaque : fèces, organes, bouillon de culture ou colonies

2.1/ Kits utilisés

Réaliser les extractions avec le **kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot de QIAGEN**

→ Le Kit et ses composants sont à conserver à température ambiante (15-25°C).

OU le kit **Nucleospin 96 Tissue de Macherey Nagel**

→ Le Kit et ses composants sont à conserver à température ambiante (15-25°C).

Matériel nécessaire pour le broyage :

- ✚ Billes pré-distribuées en collection tube 2X24 (réf. LSI : BPC)
- ✚ Billes pré-distribuées en plaque (2x96 microtubes) (réf. LSI : BPP)
- ✚ Broyeur type Tissue Lyser (réf. 85220)
- ✚ Adaptateur Plaques 2X96 (réf. 69984)
- ✚ Adaptateur Tubes 2X24 (réf. 69982)

3 S-blocks sont utilisés par extraction. Les S-Blocks sont réutilisables après nettoyage et décontamination : rinçage avec de l'eau distillée, trempage 1 minute à température ambiante dans une solution à 0,4 M HCl, vidage, et nouveau rinçage en eau distillée. Les S-Blocks sont également autoclavables après lavage.

2.2/ Témoins positifs et négatifs

EPC : Commencer l'extraction à l'étape 5d : dans le Kit TAQVET *M. paratuberculosis Advanced*, l'EPC est à extraire en même temps que les échantillons.

L'ADN extrait doit être ensuite aliquoté et conservé à -20°C.

NCS (Contrôle Négatif « Sample ») : commencer l'extraction à l'étape 5d :

Pour réaliser ce témoin de validation d'extraction, extraire 200 µl d'eau DNase RNase free au cours de l'extraction des échantillons.

NC : Negative Control : il permet de contrôler la « propreté » du mix reconstitué.

Distribuer directement 25 µl de « Mix *M. paratuberculosis Advanced* » dans la plaque d'amplification.

2.3/ Protocole d'extraction plaque avec broyage

2.3.1/ QIAamp 96 DNA Swab Biorobot

1. Préparation des échantillons :

- a. **Fèces** : Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :
Peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
Ajouter **4 mL d'eau distillée stérile**
Ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit)
Vortexer pendant 1 minute.
- b. **Organes** : Dans un tube Eppendorf :
Peser **40 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
Ajouter **500 µL d'eau**
Vortexer pendant 1 minute.
- c. **Bouillon de culture Trek** : Dans un tube Eppendorf
Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**
- d. **Colonies** : Dans un tube Eppendorf :
Prélever **2 à 3 colonies**
Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
Vortexer pendant 1 minute.

2. **Broyage en tube individuel :**

- **Fèces :** Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 min, puis **transférer 1000 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Organes :** **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Colonies en suspension ou bouillon de culture Trek :** **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).

ou

Broyage en plaque :

- **Fèces :** Transférer, après l'agitation au vortex (laisser décanter 5 à 10 min), **900 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Organes :** **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.
- **Colonies en suspension ou bouillon de culture Trek :** **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.

3. **Agiter** les tubes à l'aide d'un broyeur 2 x 5 min à 30p/sec (retourner le sens des boîtes entre les deux séries de 5 min pour un broyage homogène).

4. **Centrifuger** les tubes **1 min à 6000g**.

5. **Lyse des échantillons :**

a. Pour les **fèces** mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**) :

- **200 µl de Buffer AL.**
- **20 µl de protéinase K**
- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **200 µl d'échantillon**
- **Homogénéiser à la pipette par aller-retour.**

b. Pour les **organes** mettre dans un tube Eppendorf :

- **180 µl de Buffer ATL.**
- **20 µl de protéinase K**
- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **200 µl d'échantillon broyé**
- **Vortexer 15 secondes.**
- **Incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**
- ajouter **200 µL de Buffer AL**
- Vortexer pendant 1 minute.
- **Incuber à 70°C pendant 10 min**

Reprendre l'extraction au point n°7.

c. Pour les **colonies** ou le **bouillon de culture Trek** : mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**) :

- **200 µl de Buffer AL.**
- **20 µl de protéinase K**
- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **200 µl de suspension après broyage**
- **Homogénéiser à la pipette par aller-retour.**

d. Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**) :

- **200 µl de Buffer AL.**
- **20 µl de protéinase K**
- **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
- **200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
- **Homogénéiser à la pipette par aller-retour.**

6. Mettre un film adhésif sur le S.Block **et incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**

7. **Ajouter 200 µl d'éthanol à 100%**, et agiter par aller – retour à la pipette.

8. Mettre la **plaque d'extraction QIAamp** sur un nouveau S-Block (S-Block **2**) et y **transférer le contenu** du S Block (S-Block **1**). Couvrir avec un adhésif Air pore tape shit. **Centrifuger 4 min 6000 g.**

9. Ajouter dans la plaque d'extraction **500 µl de Buffer AW1**. Garder le S block (S-Block **2**)
Couvrir avec un Air pore tape shit. **Centrifuger 2 mins à 6000 g.**
10. Ajouter dans la plaque d'extraction **500 µl de Buffer AW2**. Changer le S Block (S-Block **3**).
Couvrir avec un Air pore tape shit. **Centrifuger 2 mins à 6000 g.**
11. **Centrifuger** 10 min à 6000 g. Garder le S-block (S-Block **3**) - (*Séchage de la membrane*)
12. Mettre la plaque d'extraction sur les Elution Microtubes (plaque bleu foncé) et ajouter **100 µl de Buffer AE*** pour éluer l'ADN. Laisser **incuber 3 min** puis **centrifuger 3 min à 6000 g.**
13. 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

2.3.2/ kit Nucleospin 96 Tissue de Macherey Nagel

1. Préparation des échantillons :

- a. **Fèces** : Dans un tube de 10 ml fourni dans le Kit TAQVET :
 - Peser **1 g de fèces** (si les fèces sont congelés prélever 1 g de l'échantillon encore congelé)
 - Ajouter **4 mL d'eau distillée stérile**
 - Ajouter **3 billes** (fournies dans le Kit).
 - Vortexer pendant 1 minute.
- b. **Organes** : Dans un tube Eppendorf :
 - Peser **40 mg d'organe finement disséqué** (dans une boîte de pétri)
 - Ajouter **500 µL d'eau**
 - Vortexer pendant 1 minute.
- c. **Bouillon de culture Trek** : Dans un tube Eppendorf
 - Prélever **500 µl de bouillon après agitation au vortex (1 minute) du flacon de culture**
- d. **Colonies** : Dans un tube Eppendorf :
 - Prélever **2 à 3 colonies**
 - Les reprendre dans **500 µl d'eau RNase DNase free**
 - Vortexer pendant 1 minute.

2. Broyage en tube individuel :

- **Fèces** : Après l'agitation au vortex, laisser décanter 5 à 10 mins, puis **transférer 1000 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Organes** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Colonies en suspension ou bouillon de culture Trek** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un tube individuel compatible avec le broyeur et contenant les billes (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).

ou

Broyage en plaque :

- **Fèces** : **Transférer**, après l'agitation au vortex (laisser décanter 5 à 10 min), **900 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur (remplir la colonne en plusieurs fois si nécessaire).
- **Organes** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.
- **Colonies en suspension ou bouillon de culture Trek** : **Transférer**, après l'agitation au vortex, **500 µl** dans un collection microtube compatible avec le broyeur et contenant les billes.

3. Agiter les tubes à l'aide d'un broyeur 2 x 5 min à 30p/sec (retourner le sens des boîtes entre les deux séries de 5 min pour un broyage homogène).

4. Centrifuger les tubes **1 min à 6000g.**

5. Lyse des échantillons :

- a. Pour les **fèces** mettre dans un bloc de lyse (Square Well bloc ou Round Well bloc) :
- **200 µl de Buffer BQ1**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon**
 - **Homogénéiser à la pipette par aller-retour.**
- b. Pour les **organes** mettre dans un tube Eppendorf :
- **180 µl de Buffer T1**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl d'échantillon broyé**
 - **Vortexer 15 secondes.**
 - **Incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C.**
 - Ajouter **200 µl de Buffer BQ1**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - **Incuber à 70°C pendant 10 min** puis Reprendre l'extraction au point n°7.
- c. Pour les **colonies** ou le **bouillon de culture Trek** : mettre dans un bloc de lyse (S-Block **1**) :
- **200 µl de Buffer BQ1**
 - **25 µl de protéinase K**
 - **5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - **200 µl de suspension après broyage**
 - **Homogénéiser à la pipette par aller-retour.**
- d. Pour le **NCS et l'EPC** mettre dans le bloc de lyse :
- 200 µl de Buffer BQ1**
 - 25 µl de protéinase K**
 - 5 µl d'IPC** (à aliquoter à réception)
 - 200 µl d'eau DNase RNase free ou d'EPC**
 - Homogénéiser à la pipette par aller-retour.**

6. Mettre un film adhésif sur le Square Well bloc (SW**1**) et **incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit (16 à 18h) à 56°C** dans un Round Well bloc (RW**1**) scellé avec bouchons.

7. Ajouter **200 µl d'éthanol à 100%** et agiter par aller – retour à la pipette (environ 5 fois).

8. Mettre la **plaque d'extraction** sur un nouveau Square Well bloc (SW**2**) et y **transférer le contenu** du SW**1** ou RW**1**. Couvrir avec un adhésif. **Centrifuger 2 min 6000 g.**

9. Ajouter dans la plaque d'extraction **600 µl de Buffer BW**. Garder le SW**2**. Couvrir avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6000 g.**

10. Ajouter dans la plaque d'extraction **900 µl de Buffer B5**. Changer le Square Well bloc (SW**3**). Couvrir avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6000 g.**

11. Vider le SW**3** et **centrifuger 10 min à 6000 g** - (*Séchage de la membrane*)

12. Mettre la plaque d'extraction sur les **MN tubes strips** (plaque bleu) et ajouter **100 µl de Buffer BE*** pour éluer l'ADN. Laisser **incuber 3 min** puis **centrifuger 3 min à 6000 g.**

13. 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.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

VIII - Reconstitution du Mix réactionnel

Avant la réalisation de la réaction PCR, il est nécessaire de reconstituer le Mix réactionnel « MPTSA » à partir des réactifs fournis dans le kit TaqVet™ (Master Mix, Eau RNase Free + Seq MPTSA).

Dans chaque Kit, un tableau de reconstitution du Mix est fourni. Suivre exactement les informations du tableau.

Un tube de Mix réactionnel « MPTSA » correspond à un nombre de réactions allant de 8 à 96 (par multiple de 8).

Avant la réalisation des Mix, penser à vortexer et à centrifuger rapidement les réactifs servant à la reconstitution des Mix.

*Ne pas conserver le Mix réactionnel « MPTSA » reconstitué.
Ne jamais mélanger de réactifs issus de Kits TaqVet™ ayant des numéros de lots différents.*

IX - Protocole d'amplification

1. Prendre une plaque MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate + Adhesive Cover et créer le plan de plaque (Logiciel Abiprism SDS):

a. Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :

M. paratuberculosis : Reporter FAM, Quencher : None.
IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA.

b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » *M. paratuberculosis (M.pt)* et le « Detector » IPC.

c. Réaliser le plan de plaque

	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA	Mix MPTSA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC MPTSA	Éch7	Éch15	Éch23	Éch31	Éch39	Éch47	Éch55	Éch63	Éch71	Éch79	Éch87
B	NCS ou NC	Éch8	Éch16	Éch24	Éch32	Éch40	Éch48	Éch56	Éch64	Éch72	Éch80	Éch88
C	Éch1	Éch9	Éch17	Éch25	Éch33	Éch41	Éch49	Éch57	Éch65	Éch73	Éch81	Éch89
D	Éch2	Éch10	Éch18	Éch26	Éch34	Éch42	Éch50	Éch58	Éch66	Éch74	Éch82	Éch90
E	Éch3	Éch11	Éch19	Éch27	Éch35	Éch43	Éch51	Éch59	Éch67	Éch75	Éch83	Éch91
F	Éch4	Éch12	Éch20	Éch28	Éch36	Éch44	Éch52	Éch60	Éch68	Éch76	Éch84	Éch92
G	Éch5	Éch13	Éch21	Éch29	Éch37	Éch45	Éch53	Éch61	Éch69	Éch77	Éch85	Éch93
H	Éch6	Éch14	Éch22	Éch30	Éch38	Éch46	Éch54	Éch62	Éch70	Éch78	Éch86	Éch94

2. Agiter l'aliquot du « Mix MPTSA Reconstitué » puis centrifuger rapidement avant ouverture. La réaction est réalisée en monocupule.

3. Déposer **20 µL de « Mix MPTSA Reconstitué »** dans toutes les cupules de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.

a. **EPC** : Déposer **5 µL d'ADN EPC** (EPC extrait) dans la cupule réservée au témoin positif.

b. **Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon** (ADN extrait) ou **5 µL de NCS** dans toutes les cupules de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.

c. **NC** : Déposer **20 µL de « Mix MPTSA Reconstitué »** dans la cupule réservée au témoin mix.

4. Couvrir la plaque avec un Adhesive Cover Optical et placer la plaque MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate 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. Lire les résultats après avoir lancé l'application « Analyse ». Nous sommes à votre disposition pour examiner vos résultats : vous pouvez nous envoyer par email le fichier SDS aux adresses suivantes : lise@lsivet.com ou jcharrot@lsivet.com.

X - Interprétation des résultats

Utiliser le logiciel ABIPRISM SDS Software.

Passer sur le module « Amplification Plot » après avoir établi une ligne de base cohérente.

Validation du test

Contrôler que l'EPC est positif en recherche *Mycobacterium paratuberculosis*:

■ Ct EPC *M. paratuberculosis* Advanced / « Detector » M. pt < 45.

Contrôler que l'EPC est positif en recherche IPC:

■ Ct EPC *M. paratuberculosis* Advanced / « Detector » IPC < 45.

Contrôler les Contrôles Négatifs:

■ Ct NCS / « Detector » IPC < 45.
Ct NCS / « Detector » *M. paratuberculosis* > 45.

■ Ct NC / « Detector » IPC > 45.
Ct NC / « Detector » *M. paratuberculosis* > 45.

Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » <i>M.pt</i>	« Detector » IPC
Positif <i>M. paratuberculosis</i>	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif <i>M. paratuberculosis</i>	Ct > 45	Ct = Ct IPC attendu ± 3 CT
Non validé (*)	Ct > 45	Ct > 45

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

Conduite à tenir pour les échantillons non validés :

En cas de présence d'inhibiteurs (IPC négatif) **diluer une partie de l'ADN au 1/10** (par exemple 5 µl d'ADN dans 45 µl d'eau) et recommencer la PCR.

En cas de présence importante et fréquente d'inhibiteurs, vous pouvez diluer systématiquement vos ADN au 1/10.