

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

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

Kit TaqVet™ *Mycoplasma bovis*

réf : MBP

Pour la détection de *Mycoplasma bovis* dans :

Liquides synoviaux

Liquides trachéo-bronchiques

Colonies

Laits

Organes

**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 RIEGER – lise@lsivet.com

Commandes / Orders
Livraisons / Delivery
Richard GIROUD – richard@lsivet.com

Informations PCR / PCR Information
Support Techniques PCR / PCR Technical Information
Stephanie Colin – stephanie@lsivet.com
Sandrine Moine – sandrine@lsivet.com
Julie Charrot – jcharrot@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 *Mycoplasma bovis*

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Réactifs fournis dans le Kit	4
III. Matériel et réactifs non fournis et conseillés	5
IV. Les échantillons	5
V. Extraction de l'ADN	7
VI. Reconstitution des Mix réactionnels	8
VII. Protocole d'amplification	8
VIII. Interprétation des résultats	9

Kit TaqVet *Mycoplasma bovis*

Pour la détection de *Mycoplasma bovis* dans les liquides synoviaux, liquides trachéo-bronchiques, les laits, les colonies et les organes par utilisation de sondes Taqman® en PCR temps réel

Réf : MBP

I – Introduction

Le Kit TaqVet *Mycoplasma bovis* pour la détection du *Mycoplasma bovis* a été développé par LSI et permet la détection de la séquence uvrC à partir de liquides synoviaux, de liquides trachéo-bronchiques, de laits, de colonies ou d'organes.

Le Kit TaqVet *Mycoplasma bovis* contient des mix déjà reconstitués (prêts à l'emploi) :

- 1 **mix** réactionnel prêt à l'emploi « Mix M.bovis » contenant :
 - ✚ 1 set de Nucléotides M.Bovis :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde M.Bovis – Sonde TaqMan® marquée **VIC – Quencher non fluorescent**.
 -
- 1 **mix** réactionnel prêt à l'emploi « Mix IPC » contenant :
 - ✚ 1 set de Nucléotides IPC :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IPC – Sonde TaqMan® marquée **VIC – TAMRA**.
- 1 **EPC** (External Positive Control) culture de *Mycoplasma bovis*

L'extraction et la purification de l'ADN bactérien sont réalisées sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA Mini Kit (Réf Qiagen 51304)

II - Réactifs fournis dans le Kit

Le kit TaqVet *Mycoplasma bovis* se présente sous la forme d'un UNIQUE coffret (conserver à -20°C) permettant la réalisation de 50 tests en bicupule. Suite à la 1^{ère} utilisation du kit, placer les tubes de « Mix M.bovis » et « Mix IPC » à +4°C. Un kit non utilisé peut-être conservé dans sa globalité (EPC et Mix) à -20°C.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Code Couleur	À réception	Après la 1 ^{ère} utilisation
Mix M.bovis	2 Tubes de 2 mL	Vert	-20°C	+4°C
Mix IPC	2 Tubes de 2 mL	Orange	-20°C	+4°C
EPC M.bovis	1 Tube de 0,5 mL	Bleu	-20°C	-20°C

Mix M.bovis et IPC: Mix réactionnels prêts à l'emploi pour PCR TaqMan®

EPC M.bovis : External Positive Control *Mycoplasma bovis* : Positif en PCR *Mycoplasma bovis*

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

1/ NCS : Negative Control Sample : Eau RNase DNase 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.bovis* » et 20 µl de « Mix IPC » dans la plaque d'amplification (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate). Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de la préparation des Mix.

III - Matériel et réactifs non fournis et recommandés

Pour l'amplification :

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

Pour l'extraction d'ADN:

Si extraction sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA Mini kit (Réf Qiagen : 51304)

- Centrifugeuse pour microtubes de type Eppendorf (8 à 15 000 g).
- Vortex ou équivalent.
- Micropipette de précision (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL) avec embouts RNase free avec barrière filtrante.
- Microtubes RNase free de 1,5mL (type Eppendorf ou équivalent).
- Tubes collecteurs de 2mL.
- Ethanol 100%.
- Eau Rnase free (DEPC-H₂O) qui servira de **Contrôle Négatif**.
- Bloc chauffant pouvant atteindre une température de 95°C.

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués.

IV – Les échantillons

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

Prélèvements

Type d'échantillon	Matériel de prélèvement
Liquides synoviaux	200 µL de surnageant
Liquides trachéo-bronchiques	200 µL de surnageant
Colonies	Prélever les colonies (quelques colonies) avec une anse de platine dans 200 µL d'eau RNase free
Laits	Culot à partir de 700 µL de lait + 700 µL de PBS
Organes	25 mg de poumon

1 / Liquides synoviaux :

Les liquides synoviaux 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 de 200 µL de liquide synovial avec le Kit QIAamp DNA mini kit (réf. : 51304) - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

2 / Liquides trachéo-bronchiques :

Les liquides trachéo-bronchiques 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 de 200 µL de liquide trachéo-bronchique avec le Kit QIAamp DNA mini kit (réf. : 51304) - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

3/ Colonies sur gélose :

Dans un tube Eppendorf, reprendre quelques colonies dans 200 µl d'eau RNase free ou équivalent. Vortexer quelques secondes. Cette suspension peut être conservé à +4°C. Le transport est possible à +4°C.

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de 200 µL de suspension bactérienne avec le Kit QIAamp DNA mini kit (réf. : 51304) - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

4/ Laits :

Le lait peut être utilisé frais ou avec conservateur (bronopol) conservé à +4°C (8 jours maximum), congelé à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

Séparation des leucocytes du lait:

1. Mélanger **700 µl** de lait avec 700 µl de PBS 1x dans un microtube DNase RNase Free de 1,5 ml.
2. Centrifuger 30 minutes à 15 000 g.
3. Eliminer le surnageant à l'aide d'une pipette.
4. Le culot obtenu peut être utilisé immédiatement pour extraction de l'ADN ou conservé 1 mois à -20°C ou plusieurs mois à -70°C ou -80°C.

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir du culot des leucocytes du lait avec le Kit QIAamp DNA mini kit (réf. : 51304) - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

5/ Organes :

L'organe (poumon) peut être utilisé frais, conservé à +4°C (8 jours maximum) ou congelé à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

Préparation de l'organe :

1. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Petri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **25 mg** maximum d'organe 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'organe avec le Kit QIAamp DNA mini kit (réf. : 51304) - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

V - Extraction de l'ADN

Respecter les consignes de manipulations de laboratoire.

L'extraction d'ADN est réalisée avec le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen 51304).

Extraction des EPC et NCS:

- **EPC (External Positive Control)** : dans le kit TaqVet M.bovis, l' EPC est à extraire en même temps que les échantillons.
- **NCS (Contrôle Négatif « Sample »)** : le NCS est à extraire en même temps que les échantillons.

Protocole d'extraction

1. Régler un block chauffant ou une étuve à 70°C.
2. Préparation des échantillons :
 - 1 Organe** : Dans un tube Eppendorf :
 - Peser **25 mg d'organe** finement disséqué
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
 - Ajouter **20 µL de Protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute
 - 2 Lait** : Dans un tube Eppendorf :
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL** sur le culot de leucocytes du lait
 - Ajouter **20 µL de Protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute
 - 3 Liquide synovial ou trachéo-bronchique** : Dans un tube Eppendorf :
 - Prélever **200 µL** de liquide
 - 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.
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 15 000 g. Jeter le tube collecteur - **conserver la colonne**.
8. Ajouter **500 µL de Buffer AW1**. Centrifuger 1 min à 15 000 g.
Jeter le tube collecteur - **conserver la colonne**.
9. Ajouter **500 µL de Buffer AW2**. Centrifuger 1 min à 15 000 g.
Jeter le tube collecteur - **conserver la colonne**.
10. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 15 000 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.

VI - Reconstitution du Mix réactionnel

Les mix M.bovis et mix IPC sont prêts à l'emploi.

- Agiter les tubes de « Mix M.bovis » et « Mix IPC ». Prélever 20 µl de « Mix M.bovis » et 20 µl de « Mix IPC » par échantillon à tester dans un tube Eppendorf (réaliser cette étape en pièce de mix pour éviter les contaminations des tubes de mix initiaux).
- Distribuer 20 µl de chacun des mix par échantillon à tester dans la microplaque PCR.

Exemple :

400 µl de « Mix M.bovis » 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

- Prendre une plaque MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate + Adhesive Cover et créer le plan de plaque (Logiciel Abiprism SDS):
 - Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :
 - █ M. bovis : Reporter VIC, Quencher : NONE.
 - █ IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA.
 - Attribuer aux colonnes impaires le « Detector » Mycoplasma bovis (M.bovis) et aux colonnes paires le « Detector » IPC.
 - Réaliser le plan de plaque.

	Mix M.bovis	Mix IPC	Mix M.bovis	Mix IPC	Mix M.bovis	Mix IPC	Mix M.bovis	Mix IPC	Mix M.bovis	Mix IPC	Mix M.bovis	Mix IPC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC	EPC										
B	NCS	NCS										
C	NC	NC										
D	Ech 1	Ech1										
E	Ech2	Ech2										
F										
G												
H												

2. Vortexer les tubes des Mix réactionnels « Mix M.bovis» et « Mix IPC » puis centrifuger rapidement avant ouverture. Ne pas oublier que la réaction est réalisée en bicupule.
3. Déposer **20 µL de « Mix M.bovis »** dans les colonnes impaires et déposer **20µL de « Mix IPC »** dans les colonnes paires de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.
 - a. **EPC** : Déposer **5 µL d'ADN EPC** (DNA extrait) dans la cupule réservée à l'EPC.
 - b. **Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon ou NCS** (ADN extrait) 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 M. bovis » et 20 µl de « Mix IPC »** dans la cupule réservée au NC.
4. Couvrir la plaque avec un Adhesive Cover et placer la plaque MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate dans l'Abiprism 7000 et 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 : nous envoyer par email le fichier SDS à l'adresse suivante : contact@lsivet.com

VIII - 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 (Mix M. bovis) est positif :

Ct EPC M. bovis / « Detector » M. bovis < 45.

Contrôler les Contrôles Négatifs (Mix M. bovis et Mix IPC) :

Ct NCS / « Detector » IPC > 45.
 Ct NCS / « Detector » M. bovis > 45.

Ct NC / « Detector » IPC > 45.
 Ct NC / « Detector » M. bovis > 45.

Interprétation des résultats

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

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

Conduite à tenir pour les échantillons non validés :

- 1/ Diluer l'ADN de l'échantillon non validé comme indiqué :
=> Dilution de l'ADN au 1/10 : 5 µl d'ADN « non validé » + 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 *M.bovis* 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 validé. 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.