

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™ *Anaplasma phagocytophilum*

Réf: ANAP
100 tests

Pour la détection des 3 biovars d'*Anaplasma phagocytophilum*

Biovar Phagocytophilum
Biovar Equi
Biovar HGE

dans:

Sang EDTA

Rate

Tiques

Par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel

PCR
PCR
Taqman
Taqman

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
 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™ *Anaplasma phagocytophilum*

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Réactifs fournis dans le Kit	4
III. Matériel et réactifs non fournis et conseillés par LSI	5
IV. Préparation des échantillons	6
a. Sangs EDTA	6
b. Rate	6
c. Tiques	7
V. Extraction de l'ADN en colonne	7
VI. Reconstitution des Mix	11
VII. Protocole d'amplification	12
VIII. Interprétation des résultats	13

Kit TaqVet™ *Anaplasma phagocytophilum*

Pour la détection d'*Anaplasma phagocytophilum* dans le sang, les rates et les tiques par utilisation de sondes Taqman® en PCR Temps Réel

Réf : ANAP

I - Introduction

Anaplasma phagocytophila est une nouvelle combinaison publiée le 15 novembre 2001, dont l'épithète spécifique a été corrigée le 14 janvier 2002 en *phagocytophilum*. Ce taxon rassemble *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (agent EGH ou HGE). *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent EGH sont phylogénétiquement plus proches d'*Anaplasma marginale* (espèce du genre *Anaplasma*) que d'*Ehrlichia canis* (espèce du genre *Ehrlichia*).

Anaplasma phagocytophilum présente les caractères du genre *Anaplasma*. Les souches d'*Anaplasma phagocytophilum* se présentent sous la forme de bactéries de petites tailles à Gram négatif, infectant les cellules de la lignée myéloblastique, notamment les granulocytes neutrophiles. *Anaplasma phagocytophilum* est un parasite strict des tiques et des mammifères. Les animaux domestiques et sauvages constituent les réservoirs des germes. Cette bactérie est transmise aux mammifères sains par des tiques du genre *Ixodes*. L'infection des tiques nécessite un repas sanguin qui doit durer au minimum 24 heures et le nombre de bactéries présentes est lié à la durée d'attachement. *Anaplasma phagocytophilum* se multiplie chez les tiques contaminées, notamment au moment de la mue larvaire. Les tiques ne constituent pas un réservoir de germes, mais elles jouent un rôle important d'amplification en permettant la multiplication des bactéries ingérées. La bactérie est principalement localisée dans les glandes salivaires des tiques.

Le biovar *Phagocytophilum* est responsable d'une maladie des ruminants, connue sous le nom de « fièvre à tiques » chez les ovins et de « fièvre des pâturages » chez les bovins. L'infection a été identifiée principalement en Europe, mais également en Inde et en Afrique du Sud. La maladie naturelle affecte les ruminants sauvages (cervidés et bovidés notamment) et les ruminants domestiques (moutons et bovins notamment). La période d'incubation est de 3 à 6 jours chez les ovins et de 4 à 17 jours chez les bovins. Le principal symptôme est une fièvre élevée dont la durée est variable. Elle est accompagnée d'une anorexie, d'une perte de poids et d'une chute de la production lactée. D'autres signes cliniques peuvent apparaître, comme une atteinte respiratoire, des avortements et une infertilité chez les mâles.

II - Réactifs fournis dans le Kit

Le kit contient les éléments suivants :

- 1 **mix** réactionnel prêt à l'emploi contenant:
 - 🧪 1 set de Nucléotides *Anaplasma phagocytophilum* :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde ANA – 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** (External Positive Control) ANA à **extraire** en même temps que les échantillons.
- 1 **IPC** (Internal Positive Control). Lors de la première utilisation, faire des aliquots de 50 µL pour éviter plusieurs cycles de décongélation.

Le kit TaqVet *Anaplasma phagocytophilum* permet la détection d'une séquence du gène *msp2* à partir de sang, de rate et de tiques. Le kit détecte les trois biovars d'*Anaplasma phagocytophilum* : biovar Phagocytophilum, biovar Equi et biovar EGH.

L'extraction et la purification de l'ADN sont réalisées avec :

- Le Kit QIAmp® DNA Mini Kit (Réf 51304 : 50 extractions ou 51306 : 250 extractions / Qiagen) pour le sang, la rate et les tiques.
- Le kit Nucleospin® Blood (Réf 740951.10 : 10 extractions ; 740951.50 : 50 extractions ; 740951.250 : 250 extractions / Macherey Nagel), uniquement pour le sang.

Le kit se présente sous la forme d'un coffret unique (composants à -20°C) permettant la réalisation de 100 tests en monocupule (détection simultanée de la cible et de l'IPC).

Chaque kit contient les réactifs suivants :

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

Mix ANAP : Mix réactionnel prêt à l'emploi pour PCR TaqMan® *Anaplasma phagocytophilum*.

EPC ANAP : External Positive Control *Anaplasma phagocytophilum* : Positif en PCR *Anaplasma phagocytophilum*, à extraire.

IPC ANAP : Internal Positive Control, à extraire.

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, utilisée par le laboratoire pour la réalisation des extractions et la préparation du mix.

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. **Prévoir 2 NCS pour une plaque.**

2/ **NC : Negative Control** : Distribuer 25 µL de « Mix ANAP » dans une cupule de la plaque d'amplification. Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination lors de la préparation du mix.

Le Kit TaqVet *Anaplasma phagocytophilum* 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 *Anaplasma phagocytophilum* 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.

III - Matériel et réactifs non fournis et conseillés par LSI

Pour l'amplification :

- Thermocycleur en temps réel
- Consommable plastique (plaques, microtubes...) compatible avec l'appareil thermocycleur en temps réel

Pour l'extraction d'ADN :

- Une centrifugeuse pour microtubes de type Eppendorf (8 à 15 000 g)
- Un vortex ou équivalent
- Micropipette de précision (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL)

- Pointes à filtres RNase/DNase free (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL)
- Microtubes RNase/DNase free de 1,5 mL (type Eppendorf ou équivalent)
- Kit QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306)
- Kit Nucleospin® Blood (réf : 740951.10 ou .50 ou .250)
- Tubes collecteurs de 2 mL
- Ethanol 100%
- Eau RNase/DNase free
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Une étuve ou un Bain-marie pouvant atteindre une température de 70 °C

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués

IV - Préparation des échantillons

Les règles d'hygiène et de sécurité à prendre en considération relèvent des procédures pour la manipulation de tissus biologiques potentiellement infectieux et des procédures de manipulation des produits chimiques.

Prélèvements

Type d'échantillon	Matériel prélevé
Sang EDTA	200µL
Rate	20 mg
Tiques	Larves et nymphes : plusieurs dizaines Tiques non gorgées : De 1 à 15 Tiques gorgées : De 1 à 3

a/ Sangs EDTA

Il est vivement conseillé de travailler à partir de sang prélevé sur tube EDTA. Si le sang est prélevé sur tube Héparine (en raison de l'effet inhibiteur de l'Héparine sur la Taq polymérase), il est indispensable de travailler uniquement sur les leucocytes.

Le sang total est utilisable frais, conservé à +4 °C (8 jours maximum), ou congelé à -20 °C (1 an), ou à -80 °C (plusieurs années). L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir du sang total avec le kit QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306) ou le kit Nucleospin® Blood (réf : 740951.10 ou .50 ou .250).

• Préparation des échantillons de sang :

1. Déposer 200µL de sang dans un tube de 1.5 mL préalablement identifié.
2. Ajouter 1 mL d'eau RNase/DNase Free. Vortexer pendant 15 secondes.
3. Centrifuger 5 min à 15000g.
4. Eliminer le surnageant.
5. Réaliser l'extraction ADN sur le culot obtenu (cf chapitre V).

b/ Rate

L'extraction de l'ADN est réalisable directement sur 20mg de rate préalablement disséquée, avec le kit QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306).

1/ Si l'organe est prélevé à proximité du laboratoire PCR (Salle d'autopsie par exemple), il est conseillé de découper des petits morceaux d'organe frais de 20mg maximum. Deux procédures sont ensuite possibles :

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

2/ Si 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 20 mg seront préparés à partir de l'organe décongelé.

• Préparation des échantillons de rate :

1. Disséquer finement le morceau de rate dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un scalpel stérile.
2. Dans un tube de 1.5 mL préalablement identifié, peser 20mg maximum de rate (disséquée) à l'aide d'une balance de précision (+/- 1 mg).
3. Réaliser l'extraction d'ADN à partir des 20mg de rate avec le kit QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306) - cf chapitre V.

Il est également possible de broyer l'échantillon de rate avec un broyeur de type « Mixer-Mill » ou « TissueLyser » avec des billes inox de 3 mm.

c/ Tiques

L'extraction de l'ADN est réalisable directement sur les tiques préalablement disséquées, avec le kit QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306).

• Préparation des échantillons de tiques :

1. Déposer les tiques dans une boîte de Pétri stérile et les disséquer finement à l'aide de pinces et d'un scalpel stérile.
2. Transférer les tiques disséquées dans un tube de 1.5 mL préalablement identifié.
3. Réaliser l'extraction d'ADN à partir des tiques préalablement disséquées avec le kit QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306) - cf chapitre V.

Il est également possible de broyer les tiques avec un broyeur de type « Mixer-Mill » ou « TissueLyser » avec des billes inox de 3 mm.

V - Extraction de l'ADN en colonne

- **Utilisation du kit QIAGEN QIAamp® DNA mini kit (réf : 51304 ou 51306)**

Composition du Kit QIAamp® DNA mini 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 - Prêt 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 % avant la première utilisation (volume indiqué sur le flacon).

Le kit QIAGEN QIAamp® DNA mini kit peut être utilisé sur des échantillons de sang EDTA, de rate et sur les tiques.

Extraction des EPC, NCS et NC :

- **EPC (External Positive Control)** : Dans le kit Taqvet ANAP, l'EPC fourni est un plasmide. L'EPC est à extraire en même temps que les échantillons. Extraire **200 µL d'EPC**.
- **NCS (Contrôle Négatif « Sample »)** : Le NCS est à extraire en même temps que les échantillons. Extraire **200 µL d'eau RNase/DNase free**.
- **NC : Negative Control** : Distribuer directement 25 µL de « Mix ANAP » dans la plaque d'amplification.

Régler une étuve ou un bain marie à 70°C (et à 56°C si nécessaire).

Protocole pour le sang EDTA :

1. Lyse des échantillons :

✚ **Sang EDTA:** Dans le tube Eppendorf contenant le culot de cellules :

- Ajouter **200 µL de Buffer AL**
- Ajouter **20 µL de Protéinase K**
- Ajouter **5 µL d'IPC**
- Vortexer pendant 1 minute.

✚ **EPC/NCS:** Dans un tube Eppendorf préalablement identifié:

- Ajouter **200 µL de Buffer AL**
- Ajouter **20 µL de Protéinase K**
- Ajouter **5 µL d'IPC**
- Ajouter **200 µL d'EPC ou d'eau RNase/DNase Free**
- Vortexer pendant 1 minute.

2. Incuber **30 minutes** à 70°C ou **toute la nuit** (16-18h) à 56°C.

3. Centrifuger rapidement les tubes avant ouverture.

4. Ajouter dans le tube **200 µL d'éthanol 100%** - Vortexer pendant 15 secs. Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient **le lysat de l'échantillon**.

5. Prendre une mini-colonne du kit QIAamp® DNA mini kit (colonne blanche) - Identifier la colonne.

6. A l'aide d'une pipette, transférer **le lysat de l'échantillon** sur la colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter le tube collecteur - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.

7. Distribuer **500 µL de Buffer AW1** (reconstitué) dans chaque colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter le tube collecteur - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.

8. Distribuer **500 µL de Buffer AW2** (reconstitué) dans chaque colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter le tube collecteur.

9. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur - Centrifuger 3 min à 12000g (*Séchage de la membrane*).

10. Placer la colonne dans un microtube de 1,5 mL préalablement identifié - Ajouter **100 µL de Buffer AE** pour éluer l'ADN - Fermer la colonne.

11. Incuber 1 min à température ambiante.

12. Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter la colonne - Conserver le microtube identifié.

Après extraction, stocker le microtube dans de la glace ou à +4°C si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C.

Protocole pour la rate et les tiques :

1. Lyse des échantillons :

✚ **Rate:** Dans le tube Eppendorf contenant les 20mg de rate disséquée:

- Ajouter **180 µL** de Buffer ATL
- Ajouter **20 µL** de Protéinase K
- Ajouter **5 µL** d'IPC
- Vortexer pendant 1 minute.

✚ **Tiques:** Dans le tube Eppendorf contenant les tiques disséquées:

- Ajouter **180 µL** de Buffer ATL
- Ajouter **20 µL** de Protéinase K
- Ajouter **5 µL** d'IPC
- Vortexer pendant 1 minute.

✚ **EPC/NCS:** Dans un tube Eppendorf préalablement identifié:

- Ajouter **180 µL** de Buffer ATL
- Ajouter **20 µL** de Protéinase K
- Ajouter **5 µL** d'IPC
- Ajouter **200 µL** d'EPC ou d'eau RNase/DNase Free
- Vortexer pendant 1 minute.

2. Incuber **30 minutes** à **70 °C** ou **toute la nuit (16-18h)** à **56 °C**.
3. Centrifuger rapidement les tubes avant ouverture.
4. Ajouter **200 µL** de Buffer AL - Vortexer pendant 15 secs.
5. Incuber **10 minutes** à **70 °C**. Centrifuger rapidement.
6. Ajouter dans le tube **200 µL** d'éthanol **100%** - Vortexer pendant 15 secs. Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
7. Prendre une mini-colonne du kit QIAmp® DNA mini kit (colonne blanche) - Identifier la colonne.
8. A l'aide d'une pipette, transférer le **lysate de l'échantillon** sur la colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter le tube collecteur - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.
9. Distribuer **500 µL** de Buffer **AW1** (reconstitué) dans chaque colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter le tube collecteur - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.
10. Distribuer **500 µL** de Buffer **AW2** (reconstitué) dans chaque colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter le tube collecteur.
11. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur - Centrifuger 3 min à 12000g (*Séchage de la membrane*).
12. Placer la colonne dans un **microtube de 1,5 mL** préalablement identifié - Ajouter **100 µL** de Buffer AE pour éluer l'ADN - Fermer la colonne.
13. Incuber 1 min à température ambiante.
14. Centrifuger 1 min à 12000g - Jeter la colonne - **Conserver le microtube identifié.**

Après extraction, stocker le microtube dans de la glace ou à +4 °C si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20 °C.

➤ **Utilisation du kit Nucleospin® Blood (réf : 740951.10 ou .50 ou .250 Macherey Nagel)**

Composition du Kit NucleoSpin® Blood:

- **Nucleospin Blood Columns:** Conservation à température ambiante: 15-25°C.
- **Collection Tubes (2 mL).**
- **Buffer B1** ⁽¹⁾: **A mélanger avec le réactif B2.** Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation.
- **Reagent B2** ⁽¹⁾: **A mélanger avec le tampon B1.** Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation.
- **Buffer B3** ⁽¹⁾: **Correspond au mélange du Buffer B1 et du Reagent B2.** 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 - Lyophilisée** ⁽²⁾. **A diluer avec le tampon Proteinase Buffer.** Conservation à température ambiante: 15-25°C sous forme lyophilisée. Stabilité : 1 an. **Une fois reprise en solution**, conservation à +4°C. Stabilité : 6 Mois
- **Buffer BW (Prêt à l'emploi)**: Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation
- **Buffer B5 (Concentré)** ⁽³⁾: **A diluer avec de l'éthanol 96-100%.** Conservation à température ambiante: 15-25°C. Stabilité : 1 an. Agiter avant utilisation.
- **Buffer BE.** **(A préchauffer à 70°C avant utilisation - Ne préchauffer que la quantité nécessaire pour la manipulation en cours).** Conservation à température ambiante: 15-25°C.

⁽¹⁾ : Transférer le Buffer B1 dans le flacon du réactif B2 et homogénéiser. Coller sur le flacon l'étiquette B3.

⁽²⁾ : Ajouter la quantité requise de Proteinase Buffer (Volume indiqué sur le flacon) et homogénéiser. La solution est stable à +4°C pendant 6 mois. Un stockage à -20°C est recommandé si la solution n'est pas utilisée pendant cette période.

⁽³⁾ : Ajouter la quantité requise d'éthanol à 96-100 % (Volume indiqué sur le flacon) avant la première utilisation.

Le kit MACHEREY NAGEL Nucleospin® Blood ne peut être utilisé uniquement sur des échantillons de sang EDTA.

Extraction des EPC, NCS et NC :

- **EPC (External Positive Control)** : Dans le kit Taqvet® ANAP, l'EPC fourni est un plasmide. L'EPC est à extraire en même temps que les échantillons. Extraire **200 µL d'EPC.**
- **NCS (Contrôle Négatif « Sample »)** : Le NCS est à extraire en même temps que les échantillons. Extraire **200 µL d'eau RNase/DNase free.**
- **NC : Negative Control** : Distribuer directement 25 µL de « Mix ANAP » dans la plaque d'amplification.

Régler une étuve ou un bain marie à 70°C.

En début de manipulation, préchauffer la quantité nécessaire de tampon BE à 70°C.

Protocole pour le sang EDTA :

1. **Lyse des échantillons :**

✚ **Sang EDTA:** Dans le tube Eppendorf contenant le culot de cellules :

- Ajouter **200 µL** de Buffer B3
- Ajouter **25 µL** de Protéinase K
- Ajouter **5 µL** d'IPC
- Vortexer pendant 1 minute.

✚ **EPC/NCS:** Dans un tube Eppendorf préalablement identifié:

- Ajouter **200 µL** de Buffer B3
- Ajouter **25 µL** de Protéinase K
- Ajouter **5 µL** d'IPC
- Ajouter **200 µL** d'EPC ou d'eau RNase/DNase Free
- Vortexer pendant 1 minute.

2. Incuber 30 minutes à 70°C.

3. Centrifuger rapidement les tubes avant ouverture.
4. Ajouter dans le tube **210 µL d'éthanol 100%** - Vortexer pendant 15 secs. Centrifuger rapidement le tube avant ouverture. On obtient le **lysate de l'échantillon**.
5. Prendre une mini-colonne du kit NucleoSpin® Blood (colonne blanche) - Identifier la colonne.
6. A l'aide d'une pipette, transférer le **lysate de l'échantillon** sur la colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 11000g - Jeter le tube collecteur - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.
7. Distribuer **500 µL de Buffer BW** dans chaque colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 11000g - Jeter le tube collecteur - Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.
8. Distribuer **600 µL de Buffer B5** (reconstitué) dans chaque colonne - Fermer la colonne - Centrifuger 1 min à 11000g - Jeter le tube collecteur.
9. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur - Centrifuger 1 min à 11000g (*Séchage de la membrane*).
10. Placer la colonne dans un **microtube de 1,5 mL** préalablement identifié - Ajouter **100 µL de Buffer BE préchauffé à 70 °C** pour éluer l'ADN - Fermer la colonne.
11. Incuber 1 min à température ambiante.
12. Centrifuger 1 min à 11000g - Jeter la colonne - **Conserver le microtube identifié.**

Après extraction, stocker le microtube dans de la glace ou à +4 °C si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20 °C.

VI - Reconstitution des Mix

Le Mix ANAP est prêt à l'emploi.

- Agiter le tube de Mix ANAP 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 ANAP »).
- Distribuer 20 µL de mix par échantillon à tester dans la microplaque PCR.

Exemple :

400 µL de « Mix ANAP » dans un tube Eppendorf pour 19 échantillons à tester (prévoir 1 échantillon en plus pour le volume mort).



Mix ANAP



Quantité de Mix
nécessaire à l'analyse



20 µL de Mix / puits PCR

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 » :
 - ANAP : Reporter FAM, Quencher : TAMRA.
 - IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA.
 - b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » ANAP et le « Detector » IPC
 - c. Réaliser le plan de plaque suivant :

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

2. Vortexer le « Mix ANAP » puis centrifuger rapidement avant ouverture.
3. Déposer **20 µL de « Mix ANAP »** 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 ANAP »** 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 page 13)

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

VIII - Interprétation des résultats :

Validation du test

Vérifier que l'EPC est positif en recherche *Anaplasma phagocytophilum* :

| Ct EPC ANAP / « Detector » ANAP: Ct attendu pour EPC pur (voir Certificat de Contrôle Qualité)

Contrôler que l'EPC est positif en recherche IPC:

| Ct EPC ANAP / « Detector » IPC: Ct attendu pour IPC (voir Certificat de Contrôle Qualité)

Vérifier les Contrôles Négatifs:

| Ct NCS / « Detector » IPC : Ct attendu pour IPC (voir Certificat de Contrôle Qualité)
Ct NCS / « Detector » ANAP: > 45.

| Ct NC / « Detector » IPC: > 45.
Ct NC / « Detector » ANAP: > 45.

Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » ANAP	« Detector » IPC
Positif <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Ct > 45	<u>Ct attendu IPC</u> (voir CQ)
Non validé (a)	Ct > 45	Ct > Ct attendu IPC (voir CQ)

(a): l'échantillon sera rendu **non validé** (ou à contrôler) en raison de la négativité de l'IPC ou de la présence d'une inhibition partielle.

Conduite à tenir pour les échantillons invalidés :

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 ANAP 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.