

PCR License

This product is offered under a license 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™ *Histophilus somnus* LSI PCR Taqman®

Réf : HSP/50

Pour la détection d'*Histophilus somnus* dans :

Ecouvillons nasaux

Aspiration trans-trachéales (ATT)

Culture bactérienne

Poumons

**par utilisation du système Taqman®
en PCR temps réel sur thermocycleurs de PCR
temps réel.**

Kit développé en partenariat avec le Laboratoire
Vétérinaire Départemental de Saône-et-Loire

**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 HS.*****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 – sandrine@lsivet.com****Stephanie Colin – stephanie@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 *Histophilus somnus*

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Réactifs fournis dans le kit	4
III. Matériels et réactifs non fournis et conseillés	5
IV. Les échantillons	5
V. Extraction de l'ADN en colonne	6
VI. Reconstitution des Mix réactionnels	8
VII. Protocole d'amplification	8
VIII. Interprétation des résultats	9

Kit TaqVet™ *Histophilus somnus*

Pour la détection d'*Histophilus somnus* par PCR temps réel dans les écouvillons nasaux et amygdaliens, les ATT, les poumons, et les cultures bactériennes

Réf : HSP

I – Introduction

Le Kit TaqVet *Histophilus somnus* contient :

- 1 **mix (SEQ HS)** contenant :
 - ✚ 1 set de Nucléotides spécifique de ***Histophilus somnus***
 - 1 Forward Primer
 - 1 Reverse Primer
 - 1 Sonde HS – Sonde TaqMan® marquée **FAM-Mgb**
 - ✚ 1 set de Nucléotides spécifique de l'**IPC** (Internal Positive Control)
 - 1 Forward Primer
 - 1 Reverse Primer
 - 1 Sonde IPC – Sonde TaqMan® marquée **VIC-Tamra**
 - 1 Flacon de **Master Mix** pour PCR TaqMan® ADN.
 - 1 **EPC HS** (External Positive Control). **ADN déjà extrait.**
- Le Kit TaqVet *Histophilus somnus* a été validé avec un ABIPRISM® 7500 (Applied Biosystems). Le Kit TaqVet *Histophilus somnus* est utilisable sur d'autres appareils de PCR en temps réel à condition que l'appareil soit validé par LSI.

Liste des appareils validés :

 - ✚ ABI 7000, 7300, 7500, Step one et Step one plus (Applied Biosystems)
 - ✚ SLAN (LSI)
 - ✚ Mx3005P (Stratagène)
 - ✚ Chromo 4 (Biorad)
 - ✚ LC2.0 et LC 480 (Roche diagnostics)
 - Les résultats sont interprétés en fonction des Ct (Cycle threshold) obtenus pour chaque échantillon :
 - ✚ **Si Ct < 45**, l'échantillon est positif pour la détection du pathogène cible.
 - ✚ **Si Ct > 45**, l'échantillon est négatif pour la détection du pathogène cible.

II - Réactifs fournis dans le Kit

Le Kit TaqVet *Histophilus somnus* se présente sous la forme d'un coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 50 tests en monocupule.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Conservation	Code Couleur
Master Mix	1 Tube	-20°C / +4°C *	Gris
SEQ HS/IPC	1 Tube	-20°C	Vert
EPC HS	1 Tube	-20°C	Marron

Master Mix : Mix réactionnel pour PCR TaqMan® ADN. * **A conserver à -20°C à réception et à +4°C après décongélation.**

SEQ HS/IPC : Pool des primers et sondes spécifiques d'*Histophilus somnus* et de l'IPC.

EPC HS : External Positive Control *Histophilus somnus* : Positif en *Histophilus somnus*.

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

1/ NCS : Negative Control Sample : Eau DNase RNase Free extraite comme un échantillon. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de l'amplification et de l'extraction. Il est conseillé de doubler au minimum ce contrôle lors de chaque extraction : un NCS en début d'extraction et un autre en fin d'extraction.

2/ NC : Negative Control : 25 µL de « Mix HS reconstitué » dans la plaque d'amplification. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

III - Matériel et réactifs non fournis et conseillés

Pour l'extraction d'ADN :

- o Etuve à 70°C.
- o Vortex ou équivalent.
- o Micropipette de précision (gamme de 0,5 ou 1 µL à 1000 µL) avec embouts RNase free avec barrière filtrante.
- o Microtubes RNase et DNase free de 1,5 mL (type Eppendorf ou équivalent).
- o Tubes collecteurs de 2 mL.
- o Ethanol 100%.
- o Eau DNase et RNase free qui servira de **Contrôle Négatif**.

L'extraction d'ADN en colonnes peut être réalisée avec les kit QIAamp DNA mini kit (Réf Qiagen 51304) ou Nucleospin Tissue de Macherey Nagel (50 ou 250 preps, réf Macherey Nagel : 740952.50 ou 740952.250).

Pour l'amplification :

Thermocycleur temps réel et son consommable de type « optical ».

Pour les manipulations :

Gants latex non talqués.

IV – Les échantillons

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

Prélèvements

Type d'échantillon	Matériel à prélever
Ecouvillons nasaux, amygdaliens	200 µL d'écouvillon élué*
Aspiration trans-trachéale	200 µL de prélèvement
Culture bactérienne (colonies)	Colonies éluées dans 2 mL de PBS
Organe : poumon	20 mg de poumon

*utiliser un écouvillon cotonné stérile avec un étui de transport.

1/ Ecouvillon :

L'écouvillon peut être utilisé frais conservé à +4°C (24H maximum) ou congelé à -20°C (1 mois maximum) ou plusieurs mois à 70°C.

1. Ajouter **1 mL** de PBS 1x dans un tube Eppendorf.
2. **Eluer** l'extrémité de l'écouvillon dans le PBS.
3. Enlever l'écouvillon en l'écrasant sur la paroi.
4. Stocker l'éluat de l'échantillons dans le PBS à -20°C.

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **200 µL** de l'éluât - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

2/ Prélèvement liquide (Aspiration Trans-Trachéale) :

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **200 µL** de ce prélèvement - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

3/ Culture bactérienne (colonies) :

Les colonies sont éluées dans 2 mL de PBS.

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **200 µL** de cet éluât de colonies - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

4/ Organe : poumon

L'organe 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).

1. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 à 30 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 20-30 mg d'organe - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN. Il est également possible de broyer les organes avec un broyeur à billes de type « Mixer-Mill » ou « TissueLyser ».

V - Extraction de l'ADN en colonne

Respecter impérativement les bonnes pratiques de laboratoire.

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

- pulvériser un désinfectant (ex : Mucocit) à la fin de chaque étape de l'extraction sur les gants et la paillasse,
- espacer au maximum les échantillons lors de l'extraction,
- multiplier les contrôles négatifs.

Extraction du NCS : Il est à extraire en même temps que les échantillons.

Extraction de l'EPC : **l'EPC n'est pas à extraire – le kit contient l'ADN déjà extrait.**

V-1- Extraction en colonne avec le kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen 51304)

1. Régler une étuve à 70°C.
2. Ajouter dans un tube Eppendorf propre :
 - **20 µL de protéinase K**
 - **180 µL de Buffer ATL**
 - **200 µL d'échantillon ou 20 mg d'organes ou d'eau** pour le NCS
 - **Vortexer 15 secondes.**
3. Incuber **30 minutes** à **70°C** ou **1 nuit** à **56°C**.
4. Ajouter **200 µL** de buffer AL - Vortexer quelques secondes - **Incuber 10 minutes** à **70°C**.
5. Ajouter **200 µL d'éthanol 100%** - Vortexer 15 secondes - Centrifuger rapidement.
6. **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.**
7. Ajouter **500 µL de Buffer AW1** - Centrifuger 1 min à 15 000 g. Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
8. Ajouter **500 µL de Buffer AW2** - Centrifuger 1 min à 15 000 g. Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
9. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 15 000 g. (*Séchage de la membrane*)

10. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 mL et ajouter **200 µL de Buffer AE** pour éluer l'ADN - Laisser incubé 1 min puis centrifuger à 6 000 g pendant 1min.
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.

V-2- Extraction en colonne avec le kit Nucleospin Tissue de Macherey Nagel (50 ou 250 preps, réf Macherey Nagel : 740952.50 ou 740952.250)

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.

Extraction de l'ADN des échantillons

1. **Tissu – Eluât d'écouvillon – Liquides – NCS**: mettre dans un tube Eppendorf :
 - **180 µL de Buffer T1**
 - **25 µL de protéinase K**
 - **20 mg d'organe** finement disséqué ou **200 µL d'échantillon liquide**
 - **Vortexer 15 secondes.**
2. **Incuber 30 min à 70°C** à l'étuve **ou 1 nuit (16 à 18h) à 56°C** - Vortexer quelques secondes.
3. Ajouter **200 µL de Buffer B3** puis vortexer pendant 15 secondes - **Incuber 10 min à 70°C.**
4. **Ajouter 200 µL d'éthanol à 100%** et vortexer vigoureusement quelques secondes - Centrifuger rapidement les tubes.
5. **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.**
6. **Ajouter 500 µL de Buffer BW** - **Centrifuger 1 min** à vitesse maximum (11 000 g).
7. Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
8. **Ajouter 600 µL de Buffer B5** - **Centrifuger 1 min** à vitesse max (11 000 g).
9. Jeter le tube collecteur - **Conserver la colonne.**
10. Poser la colonne sur un nouveau tube collecteur et **centrifuger 3 min** à vitesse maximale (11 000 g) pour le séchage de la membrane.
11. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 mL et ajouter **200 µL de Buffer BE** pour éluer l'ADN - Laisser **incuber 1 min puis centrifuger à vitesse maximum pendant 1 min** (11 000 g).
12. 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

Avant la réalisation de la réaction PCR, il est nécessaire de reconstituer les Mix réactionnels « HS/IPC » à partir des réactifs communs (Master Mix, Eau DNase - RNase Free, Séquences HS/IPC).

Dans chaque kit, un tableau de reconstitution du Mix est fourni avec le certificat du contrôle qualité.

Ne pas conserver les Mix réactionnels reconstitués.

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

VII - Protocole d'amplification

1. Prendre une plaque d'amplification et créer le plan de plaque (Logiciel Abiprism SDS) :
 - a. Dans tous les puits, utiliser le détecteur **FAM** pour la détection de la cible *Histophilus somnus* et le détecteur **VIC** pour la détection de l'**IPC**.
 - b. Réaliser le plan de plaque suivant :

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

2. Déposer **20 µL de Mix « HS/IPC »** dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - a. **EPC** : Déposer **5 µL d'ADN**.
 - b. **Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon** (ADN extrait) **ou de NCS** dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - c. **NC** : Déposer **25 µL de Mix « HS/IPC »** dans la cupule réservée au NC.
3. Couvrir la plaque avec un adhésif et placer la plaque (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 - 15 minutes - Répétition : 1

Etape 3 : 94°C - 1 min puis 60°C - 1min 30 - Répétitions : 45

VIII – Interprétations des résultats

Utiliser le logiciel fourni avec le thermocycleur (**ABIPRISM SDS Software pour le thermocycleur Applied 7500**). Passer sur le module « Amplification Plot » après avoir établi une ligne de base cohérente.

Validation du test

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

| Ct EPC HS / « Detector » HS < 45.

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

| Ct NCS / « Detector » IPC > 45.
| Ct NCS / « Detector » HS > 45.

| Ct NC / « Detector » IPC > 45.
| Ct NC / « Detector » HS > 45.

Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » HS	« Detector » IPC
Positif <i>Histophilus somnus</i>	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif <i>Histophilus somnus</i>	Ct > 45	<u>Ct < 45</u>
Non validé (a)	Ct > 45	Ct > 45

(a): 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) :

- 1/ Diluer l'ADN de l'échantillon 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 HS 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.

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