

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™ IBR gB

Réf : IBRP

Pour détection du BVH1 dans :

Lavages pulmonaires

Ecouvillons nasaux

Semences

Leucocytes de sang total

par utilisation de sondes TaqMan®
en PCR temps réel

Attention
modifications du kit

Coffret unique à -20°C à réception



LSI

Laboratoire Service International

6 Allée des écureuils

Parc d'activité du Bois Dieu

69380 LISSIEU – France

Tel : + (33) 04 72 54 82 82

Fax : + (33) 04 72 54 82 83

Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 17h.

Office open from Monday until Friday : 9 am to 5 pm.

Direction / Management

Eric SELLAL - eric@lsivet.com

Patricia GIROUD – Patricia@lsivet.com

Marketing & commercial / Marketing & commercial

Informations commerciales / Commercial Information

Lise GREWIS – lise@lsivet.com

Commandes / Orders

Livraisons / Delivery

Richard GIROUD – Richard@lsivet.com

Informations PCR / PCR Information

Supports Techniques PCR / PCR Technical Information

Sandrine Moine – sandrine@lsivet.com

Mylène Salus – mylene@lsivet.com

Julie Charrot – jcharrot@lsivet.com

Stéphane Daly – sdaly@lsivet.com

Stéphanie Colin – stephanie@lsivet.com

Informations ELISA / ELISA Information

Supports Techniques ELISA / ELISA Technical Information

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 IBR gB

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Réactifs fournis dans le Kit	5
III. Matériel et réactifs non fournis et conseillés	5
IV. Les échantillons	6
V. Extraction de l'ADN	7
VI. Préparation des Mix réactionnels	8
VII. Protocole d'amplification	8
VIII. Interprétation des résultats	10

Kit TAQVET IBR gB

Pour la détection de l'IBR dans les leucocytes du sang total, les écouvillons nasaux, les lavages pulmonaires et les semences, par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel

Réf : IBRP

I - Introduction

Le Kit TAQVET IBR permet de détecter la glycoprotéine gB du virus BVH1 (Bovine Herpes Virus 1) sur les animaux en cours d'infection à partir de leucocytes du sang total, d'écouvillons nasaux, de lavages pulmonaires et de semences. La détection du virus BHV1 à l'état de latence est impossible.

1/ Kit TAQVET IBR gB :

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

- La détection spécifique simultanée de l'ADN de l'IBR et la détection de l'IPC (**I**nternal **P**ositive **C**ontrol) est réalisée en une seule cupule. La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons.

L'IPC est un Internal Positive Control endogène aux cellules bovines.

L'EPC est un antigène purifié inactivé. L'EPC ne contient pas la séquence de l'IPC. La détection de l'IPC dans l'EPC donnera une réponse nulle.

Le Kit TAQVET IBR contient :

- 1 **mix réactionnel prêt à l'emploi** contenant:
 - ✚ 1 set de Nucléotides IBR :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IBR – Sonde TaqMan® marquée **VIC – TAMRA**.
 - ✚ 1 set de Nucléotides IPC :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IPC – Sonde TaqMan® marquée **FAM - TAMRA**.
 - ✚ 1 **Master Mix** pour PCR TaqMan® ADN.
- 1 **EPC IBR** (External Positive Control).

- L'extraction et la purification de l'ADN bactérien sont réalisées sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA Mini Kit (Réf Qiagen 51304).
- Le Kit TAQVET IBR a été validé et doit être utilisé avec un ABIPRISM® 7000 ou 7300 ou 7500 HT (Applied Biosystems). Le Kit TAQVET IBR 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 (Treshold Cycle) obtenus pour chaque échantillon :

- **Si Ct échantillon < 45**, l'échantillon est positif.
- **Si Ct échantillon > 45**, l'échantillon est négatif.

II - Réactifs fournis dans le Kit

Le Kit TAQVET IBR se présente sous la forme d'un UNIQUE coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 50 tests en monocupule. Suite à la 1^{ère} utilisation du kit, placer le tube « Mix IBR » à +4°C. Un kit non utilisé peut-être conservé dans sa globalité (EPC et Mix IBR) à -20°C.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

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

Mix IBR: Mix réactionnel prêt à l'emploi pour PCR TaqMan® *IBR gB*.

EPC IBR : External Positive Control IBR : Positif en PCR IBR.

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 : 20 µL de « Mix IBR » dans la plaque d'amplification. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

III - Matériel et réactifs non fournis et conseillés

Pour l'extraction d'ADN :

- Si extraction sur colonnes avec le Kit QIAamp DNA mini kit (Ref Qiagen : 51304) :
 - 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 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**.
 - o Un bloc chauffant ou une étuve pouvant atteindre une température de 70°C.

Pour l'amplification :

- Un thermocycleur avec son consommable : Optical 96-well Reaction Plates et Adhesive Covers.

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués.

IV - Les échantillons

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

Prélèvements

Type d'échantillon	Matériel de prélèvement
Leucocytes	Tube EDTA ou héparine
Lavage pulmonaire	Pot de prélèvement
Semence	Pot de prélèvement
Ecouvillons nasaux	Ecouvillons

1/ Leucocytes extraits du sang total :

Il est possible de travailler directement sur les leucocytes du sang prélevé sur tube EDTA ou sur tube héparine.

Séparation des leucocytes des sangs :

1. Mélanger dans un tube à hémolyse 2 mL de sang et 2 mL de Solution de lyse (Disponible auprès de LSI : Réf SLAG – Lysis Solution – 500 mL Prêt à l'emploi).
2. Vortexer et incubé 10 minutes à température ambiante.
3. Centrifuger 10 minutes à 1500g à 4°C et éliminer le surnageant.
4. Distribuer de nouveau 2 mL de Solution de lyse dans le tube – Agiter délicatement afin de remettre en suspension le culot.
5. Répéter les étapes 2, 3 et 4.
6. Transférer 1 mL de la solution (culot en suspension) dans 2 microtubes DNase RNase free de 1,5 mL.
7. Centrifuger les 2 tubes, 5 minutes à 1500g et éliminer le surnageant.
8. Le culot obtenu peut être utilisé immédiatement pour extraction de l'ADN ou conservé 1 mois à -20°C ou plusieurs mois à -70 ou -80°C. Nous recommandons d'utiliser un des 2 culots pour une extraction rapide de l'ADN et de conserver l'autre culot pour un éventuel contrôle (en cas de présence d'inhibiteurs dans le premier culot).

2/ Ecouvillons Nasaux :

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 **500 µL** de PBS 1x dans le tube contenant l'écouvillon.
2. Vortexer 1 minute à vitesse maximum.
3. Enlever l'écouvillon en l'écrasant bien sur la paroi.
4. Récupérer et stocker le PBS contenant les cellules de l'écouvillon dans un tube Eppendorf 1,5 mL.

3/ Lavages pulmonaires / Semences :

- Transférer **le lavage pulmonaire** (environ 10 mL) dans un tube à fond conique (type Falcon) et centrifuger 5 min à 1500g. Éliminer le surnageant et conserver le culot cellulaire ainsi obtenu.

Ce culot peut être utilisé immédiatement pour extraction de l'ADN ou conservé 1 mois à -20°C ou plusieurs mois à -70 ou -80°C. Commencer l'extraction comme indiqué page 7.

- Transférer les **semences** (environ 5 mL) dans un tube à fond conique (type Falcon) et centrifuger 5 min à 1500g. Trois phases sont ainsi obtenues : le liquide séminal, les leucocytes et cellules épithéliales, et les spermatozoïdes.

Récupérer la phase contenant les leucocytes et cellules épithéliales.

Ce « culot » peut être utilisé immédiatement pour extraction de l'ADN ou conservé 1 mois à -20°C ou plusieurs mois à -70 ou -80°C. Commencer l'extraction comme indiqué page 7.

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).

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 % (volume indiquée sur le flacon) avant la première utilisation.

Extraction des EPC, NCS et NC :

- **EPC (External Positive Control)** : Dans le Kit TAQVET IBR, l'EPC fourni est de l'antigène. L'EPC est à extraire en même temps que les échantillons. Le volume d'EPC fourni permet de faire 2 extractions (selon protocole décrit ci-dessous). L'ADN EPC sera à aliquoter et à conserver à -20°C.

- **NCS (Contrôle Négatif « Sample »)** : Le NCS est à extraire en même temps que les échantillons.

- **NC : Negative Control** : Distribuer directement 25 µL de « Mix IBR » dans la plaque d'amplification.

Protocole :

1. Régler un block chauffant ou une étuve à 70°C.
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Leucocytes / Lavages pulmonaires / Semences** : Dans un tube Eppendorf :
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL** sur le **culot cellulaire**
 - Ajouter **20 µL de Protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - ✚ **Ecouvillon Nasaux** : Dans un tube Eppendorf :
 - Prélever **200 µL** d'éluât d'écouvillon
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
 - AJouter **20 µL de Protéinase K**
 - Vortexer pendant 1 minute.
 - ✚ **EPC- NCS** : Dans un tube Eppendorf :
 - Prélever **200 µL** d' EPC ou d' Eau pour le NCS
 - 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 (entre 10 et 30 min).
4. Vortexer quelques secondes.
Ajouter **200 µL de Buffer AL** et vortexer **15 secondes**.
5. Incuber **10 minutes** à **70°C**.
6. Ajouter **200 µL d'éthanol 100%** - Vortexer 15 secondes - Centrifuger rapidement.
7. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci - Centrifuger 1 min à 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 incubé 1 min puis centrifuger à 6000 g pendant 1 min.
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 - Préparation des Mix réactionnels

Le Mix IBR est prêt à l'emploi.

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

Exemple :

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



Mix IBR



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. Prendre une microplaque et un Adhesive Cover et créer le plan de plaque :
 - a. Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :
 - IBR : Reporter VIC, Quencher : TAMRA.
 - IPC : Reporter FAM, Quencher : TAMRA.
 - b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » IBR et le « Detector » IPC.
 - c. Réaliser le plan de plaque suivant :

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

2. Vortexer le « Mix IBR » puis centrifuger rapidement avant ouverture. Distribuer le mix dans chaque cupule : test en monocupule.
3. Déposer **20 µL de « Mix IBR »** dans toutes les cupules de la microplaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - a. **EPC** : déposer **5 µL d'ADN EPC** (ADN extrait) dans la cupule réservée à l'EPC.
 - b. **Echantillons et NCS** : déposer **5 µL d'échantillon ou de NCS** (ADN extrait) dans toutes les cupules de la microplaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - c. **NC** : Déposer **20 µL de « Mix IBR »** dans la cupule réservée au NC.
4. Couvrir la microplaque avec un Adhesive Cover et la placer dans le thermocycleur.
5. Lancer l'amplification selon le programme suivant :

Etape 1 : 50°C – 2 minutes – Répétition : 1

Etape 2 : 95°C – 10 minutes – Répétition : 1

Etape 3 : 95°C – 15 secondes puis 60°C – 1 minute – Répétitions : 45

Interprétation des résultats (cf § VIII ci-dessous)

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

VIII - Interprétation des résultats

Validation du test

Contrôler que l' EPC est positif :

- | Ct EPC IBR / « Detector » IBR < 45.
- | Ct EPC IBR / « Detector » IPC > 45.

Contrôler que les Contrôles Négatifs sont négatifs :

- | Ct NCS / « Detector » IBR > 45.
- | Ct NCS / « Detector » IPC > 45.
- | Ct NC / « Detector » IBR > 45.
- | Ct NC / « Detector » IPC > 45.

Interprétation des résultats

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

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

Conduite à tenir pour les échantillons non-validés

1. Diluer l'ADN extrait au 1/10^{ème} en eau DNase et RNase free.
2. Renouveler l'analyse PCR sur cette dilution et interpréter les résultats obtenus.
3. Si l'échantillon est toujours non validé, refaire une extraction de l'échantillon en le diluant au préalable au 1/10^{ème} en eau DNase et RNase free.
4. Renouveler l'analyse PCR et interpréter les résultats obtenus à partir de la nouvelle extraction d'ADN.