

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™ Ruminants Rotavirus-Coronavirus

50 tests

Réf : RRC

Pour détection des rotavirus et coronavirus des ruminants dans :

Fèces

**par utilisation de sondes TaqMan®
en PCR temps réel**

**Attention
Modification de la notice
en pages 4, 6 et 7**



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
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™ Ruminants Rotavirus-Coronavirus

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Composition et conditionnement du Kit	4
III. Matériel et réactifs non fournis et recommandés	5
IV. Extraction des ARNs	6
V. Dénaturation des ARNs	7
VI. Reconstitution du Mix réactionnel	8
VII. Protocole d'amplification	8
VIII. Interprétation des résultats	9

Kit TaqVet™ Ruminants Rotavirus-Coronavirus

Pour la détection des rotavirus et coronavirus des ruminants dans les fèces par utilisation de sondes Taqman® en PCR temps réel

Réf : RRC

I – Introduction

Le kit Taqvet Ruminants Rotavirus-Coronavirus a été développé par LSI pour la détection des rotavirus et coronavirus des ruminants, principaux pathogènes responsables de diarrhées d'origine virale chez les veaux nouveau-nés. Ce kit permet la détection conjointe des ces deux pathogènes ainsi que d'un IPC (PCR en multiplex).

Les primers et sondes ont été dessinés dans les régions les plus conservées du génome de ces virus. Le kit Taqvet Ruminants Rotavirus-Coronavirus ainsi développé permet de détecter les rotavirus du groupe A d'origine bovine, équine et ovine ainsi que les coronavirus d'origine bovine et équine.

Le kit Taqvet Ruminants Rotavirus-Coronavirus est utilisable sur fèces de veaux diarrhéiques.

II – Composition et conditionnement du kit

II-1 – Composition du kit

Le Kit TaqVet™ Ruminants Rotavirus-Coronavirus contient :

- **1 Mix réactionnel prêt à l'emploi** composé de :
 - ✚ 1 Set de Nucléotides spécifique des rotavirus :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde rotavirus – Sonde Taqman® marquée FAM - Mgb.
 - ✚ 1 Set de Nucléotides spécifique des coronavirus :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde coronavirus – Sonde Taqman® marquée VIC - Mgb.
 - ✚ 1 Set de Nucléotides spécifique de l'IPC :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IPC – Sonde Taqman® marquée Cy5 - BHQ.
 - ✚ **Master Mix** pour RT-PCR temps réel Taqman.
- **1 IPC** (Internal Positive Control). Lors de la première utilisation, faire des aliquots pour éviter plusieurs cycles de congélation / décongélation.
- **1 EPC Rota-Corona** (External Positive Control Rotavirus-Coronavirus : positif rotavirus et coronavirus en RT-PCR temps réel).
Déjà extrait.
Aliquoter l'EPC à réception pour éviter la succession des cycles de congélation-décongélation.
- L'extraction et la purification des ARN viraux rotavirus et coronavirus sont réalisées simultanément **sur colonnes** : avec le kit **QIAmp® Viral RNA Mini Kit** (Réf Qiagen 52904 ou 52906), ou le **kit Nucleospin® RNA Virus** (Réf Macherey Nagel 740956.50 ou 740956.250).
- Le Kit TaqVet™ Ruminants Rotavirus-Coronavirus 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™ Ruminants Rotavirus-Coronavirus 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 virale contenue dans l'échantillon est importante.
 - **Si Ct échantillon > 45**, l'échantillon est négatif.

II-2 – Conditionnement

Le Kit LSI TaqVet Ruminants Rotavirus-Coronavirus se présente sous la forme d'un coffret (composants à -20°C) et d'un grand sachet (composants à température ambiante) permettant chacun la réalisation de 50 tests en monocupule.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Conservation	Code Couleur
Mix Rota-Corona	1 Tube de 2 mL	-20°C	Vert
EPC Rota-Corona	1 Tube de 0,5 mL	-20°C	Marron
IPC Rota-Corona	1 Tube de 0,5 mL	-20°C	Jaune
 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 RNase 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 Rotavirus-Coronavirus » dans la plaque d'amplification (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate). Un résultat négatif indiquera alors l'absence de contamination du Mix.

III - Matériel et réactifs non fournis et recommandés

1/ Pour l'amplification :

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

2/ Pour l'extraction d'ARN viral en colonne

- Kit d'extraction QIAmp® Viral RNA Mini Kit (Réf Qiagen 52904 ou 52906)
- Kit d'extraction Nucleospin® RNA Virus (Réf Macherey Nagel 740956.50 ou 740956.250)
- Une centrifugeuse pour microtubes de type Eppendorf (8 à 15 000 g)
- Microtubes RNase free de 1,5 mL (type Eppendorf ou équivalent)
- Tubes collecteurs de 2 mL
- Ethanol 96-100%
- Eau Rnase free (DEPC-H₂O) qui servira de **Contrôle Négatif**.

3/ Pour les manipulations :

- Gants latex **non poudrés**.

IV - Extraction des ARNs Rotavirus et Coronavirus

IV-1 – Préparation des fèces avant extraction

Les fèces sont utilisables frais, conservés à +4°C (8 jours maximum) ou congelés à -20°C (1 an maximum).

- Dans le cas d'échantillons suffisamment liquides pour être prélevés à la pipette, la prise d'essai sera constituée de 1 mL de fèces.
- Dans le cas contraire d'échantillons trop consistants, la prise d'essai sera constituée de 1 gramme de fèces.

1. Dans un tube de 10 mL fourni dans le Kit TAQVET, prélever **1 mL de fèces liquides** ou **1 g de fèces solides**.
2. Ajouter **4 mL d'eau distillée** et **2 Billes** – Vortexer 1 minute.
3. **Transférer 1 mL** de fèces dilué dans un microtube 1,5 mL.
4. Centrifuger **1 min à 3 000 g** pour culotter les débris.
5. L'extraction s'effectuera **sur 135 µL de surnageant**. L'intégralité du surnageant peut être prélevée et conservée à -20°C s'il est nécessaire de répéter l'extraction.

IV-2 – Extraction avec le kit Macherey Nagel Nucleospin® RNA Virus, Réf : 740956.50 ou 740956.250

Composition du Kit Nucleospin® RNA Virus, Réf : 740956.50 ou 740956.250

- Colonnes : NucleoSpin® RNA Virus
- Collection Tubes (2 mL)
- Buffer RAV1 ^{(1) (2)}
- Buffer RAW ⁽¹⁾
- Buffer RAV3 ⁽³⁾
- Carrier RNA ⁽²⁾
- RNase-Free Water

⁽¹⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

⁽²⁾ : Ajouter le Carrier RNA au tampon RAV1 avant extraction. Le tampon RAV1-Carrier reconstitué peut être conservé 1 mois à 4°C

⁽³⁾ : Fourni sous forme concentrée. Avant la première utilisation, ajouter 4 Volumes d'éthanol (96-100%) comme indiquée sur le flacon.

- L'extraction du NCS (Contrôle Négatif « sample ») sera réalisée dans les conditions ci-dessous (Extraction de 135 µL d'eau DNase/RNase-free + 5 µL d'IPC).

1. Distribuer **560 µL de tampon RAV1+Carrier** dans un microtube de 1,5 mL.
2. Dans le microtube contenant le **tampon RAV1+Carrier**, distribuer **135 µL d'échantillon** et **5 µL d'IPC** – Vortexer 15 secondes – Incuber 10 minutes à température ambiante – Centrifuger brièvement les tubes.
3. Ajouter **560 µL d'éthanol** à 100% – Vortexer 15 secondes – Centrifuger brièvement les tubes.
4. Prendre les mini-colonnes du kit Nucleospin® et les **identifier**.
5. A l'aide d'une pipette, transférer **630 µL d'échantillon** sur la colonne – boucher – **centrifuger 1 minute à 8.000g** – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.

Attention la distribution de l'échantillon se fait en deux fois : risque d'erreur

6. A l'aide d'une pipette, transférer les **630 µL restant de l'échantillon** sur la colonne – boucher – **centrifuger 1 minute à 8000g** – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.
7. Ajouter **500 µL de Buffer RAW** sur chaque colonne – **centrifuger 1 min à 8000 g** – Jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.
8. Ajouter **600 µL de Buffer RAV3** sur chaque colonne – **centrifuger 1 min à 8000 g** – Jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.
9. Poser la colonne sur un nouveau tube collecteur – **centrifuger 3 min à 11000 g** – Jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**. (*Séchage de la membrane*)
10. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 mL et distribuer **50 µL d'eau DNase/RNase-free**.
11. Laisser **incuber 1 min** à température ambiante puis **centrifuger 1 min à 8000 g** pour éluer les ARNs.
12. Placer le tube d'éluat dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver à -20°C ou à -80°C. **Les ARNs élués doivent être dénaturés avant de réaliser la réaction de PCR temps réel.**

IV-3 – Extraction avec le kit QiaGen QIAamp® viral RNA, Réf : 52904 ou 52906

Composition du Kit QIAamp® viral RNA, Réf : 5290 ou 52906

- Colonnes QIAamp®
- Collection Tubes (2 mL)
- Buffer AVL ^{(1) (2)}
- Buffer AW1 ^{(1) (3)}
- Buffer AW2 ⁽³⁾
- Buffer AVE
- Carrier RNA ⁽²⁾

⁽¹⁾ : Non compatible avec les désinfectants contenant de l'eau de Javel.

⁽²⁾ : Ajouter le Carrier RNA au tampon AVL avant extraction. Le tampon AVL-Carrier reconstitué peut être conservé 1 mois à 4°C

⁽³⁾ : Fourni sous forme concentrée. Avant la première utilisation, le volume approprié d'éthanol (96-100%) comme indiquée sur le flacon.

- L'extraction du NCS (Contrôle Négatif « sample ») sera réalisée dans les conditions ci-dessous (Extraction de 135 µL d'eau DNase/RNase-free + 5 µL d'IPC).

1. Distribuer **560 µL de tampon AVL+Carrier** dans un microtube de 1,5 mL.
2. Dans le microtube contenant le **tampon AVL+Carrier**, distribuer **135 µL d'échantillon** et **5 µL d'IPC** – Vortexer 15 secondes – Incuber 10 minutes à température ambiante – Centrifuger brièvement les tubes.
3. Ajouter **560 µL d'éthanol** à 100% – Vortexer 15 secondes – Centrifuger brièvement les tubes.
4. Prendre les mini-colonnes du kit QIAamp® et les **identifier**.
5. A l'aide d'une pipette, transférer **630 µL d'échantillon** sur la colonne – boucher – **centrifuger 1 minute à 6000g** – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.

Attention la distribution de l'échantillon se fait en deux fois : risque d'erreur

6. A l'aide d'une pipette, transférer les **630 µL restant de l'échantillon** sur la colonne – boucher – **centrifuger 1 minute à 6000g** – jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.
7. Ajouter **500 µL de Buffer AW1** sur chaque colonne – **centrifuger 1 min à 6000 g** – Jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.
8. Ajouter **500 µL de Buffer AW2** sur chaque colonne – **centrifuger 3 min vitesse maximale** – Jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**.
9. Poser la colonne sur un nouveau tube collecteur – **centrifuger 1 min à vitesse maximale** – Jeter le tube collecteur – **conserver la colonne**. (*Séchage de la membrane*)
10. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 mL et distribuer **50 µL de Buffer AVE**.
11. Laisser **incuber 1 min** à température ambiante puis **centrifuger 1 min à 6000 g** pour éluer les ARNs.
12. Placer le tube d'éluat dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver à -20°C ou à -80°C. **Les ARNs élués doivent être dénaturés avant de réaliser la réaction de PCR temps réel.**

V - Dénaturation des ARNs

Pour chaque échantillon, incluant les témoins négatifs d'extraction et les témoins positifs (EPC) de RT-PCR :

1. Mettre dans une plaque 96 puits, **10 µL de chaque ARN** par puits.
2. Sceller les puits avec des barrettes de bouchons de tailles correspondantes.
3. Chauffer pendant **3 minutes à 95°C** dans le thermocycleur, puis déposer immédiatement les échantillons dans la glace pilée ou sur un bloc réfrigéré (4°C) jusqu'à utilisation.
4. Centrifuger la plaque avant de prélever les échantillons.

L'amplification doit suivre directement la dénaturation.

VI - Reconstitution du Mix réactionnel

Le mix de RT-PCR est prêt à l'emploi, il ne nécessite donc aucune reconstitution avant l'ajout de l'extrait d'ARN à tester.

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

VII - 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 3 « Detectors » :
 - Rotavirus : Reporter FAM, Quencher : None.
 - Coronavirus : Reporter VIC, Quencher : None
 - IPC : Reporter Cy5, Quencher : None.
 - b. Attribuer à chaque cupule le « Detector » Rotavirus, le « Detector » Coronavirus et le « Detector » IPC.
 - c. Réaliser le plan de plaque.

	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona	Mix Rota-Corona
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC Rota-Corona	Éch7	Éch15	Éch23	Éch31	Éch39	Éch47	Éch55	Éch63	Éch71	Éch79	Éch87
B	NC	Éch8	Éch16	Éch24	Éch32	Éch40	Éch48	Éch56	Éch64	Éch72	Éch80	Éch88
C	NCS	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 le Mix « Rota-Corona » puis centrifuger rapidement avant ouverture. La réaction est réalisée en monocupule.
3. Déposer **20 µL de Mix « Rota-Corona »** dans toutes les cupules de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.
 - a. **EPC** : Déposer **5 µL d' EPC** dans la cupule réservée au témoin positif.
 - b. **NC** : Déposer **20 µL de Mix « Rota-Corona »** dans la cupule réservée au témoin mix.
 - c. **Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon** (ARN extrait) ou **5 µL de NCS** dans toutes les cupules de la MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate qui seront utilisées pour l'essai.
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 : 45°C – 10 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 : envoyer votre plaque (fichier SDS) par e-mail à : 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 est positif en recherche Rotavirus:

■ Ct EPC « Rota-Corona » / « Detector » Rotavirus < 45.

Contrôler que l' EPC est positif en recherche Coronavirus:

■ Ct EPC « Rota-Corona » / « Detector » Coronavirus < 45.

Contrôler les Contrôles Négatifs:

■ Ct NCS / « Detector » IPC < 45.
 Ct NCS / « Detector » Rotavirus > 45.
 Ct NCS / « Detector » Coronavirus > 45.

■ Ct NC / « Detector » IPC > 45.
 Ct NC / « Detector » Rotavirus > 45.
 Ct NC / « Detector » Coronavirus > 45.

Interprétation des résultats

Interprétation		« Detector » Rotavirus	« Detector » Coronavirus	« Detector » IPC
Positif Rotavirus	Négatif Coronavirus	Ct < 45	Ct > 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif Rotavirus	Positif Coronavirus	Ct > 45	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Positif Rotavirus	Positif Coronavirus	Ct < 45	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif Rotavirus	Négatif Coronavirus	Ct > 45	Ct > 45	<u>Ct < 45</u>
Non validé (a)		Ct > 45	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) **diluer une partie des ARNs extraits 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 ARNs au 1/10.