

VetMAX™ M. paratuberculosis 2.0 Kit

PCR temps réel TaqMan® pour la détection de *Mycobacterium paratuberculosis*

Référence Catalogue MPTSA

Partie N° 100020396 Pub. N° MAN0007609 Rév. B.0

Technique	Espèce(s)	Acides nucléiques isolés à partir des matrices	Test
PCR temps réel (ADN) - Duplex - IPC exogène	Bovins Ovins Caprins	Fèces Organes Colonies bactériennes Bouillon de culture (issu du système automatisé de cultures des mycobactéries « VersaTREK »)	Individuel

 **AVERTISSEMENT !** Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés. Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse thermofisher.com/support.

 **AVERTISSEMENT ! RISQUES BIOLOGIQUES POTENTIELS.** Lire les informations de sécurité relatives aux risques biologiques du produit disponibles sur thermofisher.com. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés.

Informations sur le produit

Description du produit

Applied Biosystems™ VetMAX™ M. paratuberculosis 2.0 Kit est un outil de diagnostic moléculaire permettant la détection par PCR temps réel de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (plus couramment nommée *Mycobacterium paratuberculosis*), en ciblant la séquence d'insertion IS900. La séquence IS900 fait partie de la famille des séquences d'insertion IS110 et est répétée entre 14 et 18 fois sur le génome de *Mycobacterium paratuberculosis*.

Le VetMAX™ M. paratuberculosis 2.0 Kit ne détecte aucune des autres séquences d'insertion de la famille IS110, y compris la séquence IS1626 spécifique de *M. intracellulare* et de *M. avium*, qui est la plus similaire de l'IS900 (82% d'homologies).

Chaque échantillon d'ADN obtenu après extraction est analysé en monocupule : la même cupule est utilisée pour la détection spécifique de l'ADN bactérien de *Mycobacterium paratuberculosis* et pour la détection d'un IPC (Internal Positive Control). La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteur dans les échantillons.

Il est utilisable sur ADN bactériens extraits à partir de de **fèces**, d'**organes**, de **colonies bactériennes**, ou de **bouillon de culture** (issu du système automatisé de culture des mycobactéries « VersaTREK »).

Les protocoles complets d'extractions des ADN bactériens à partir de ces matrices sont disponibles sur demande au Support Technique.

Réactifs du kit et conservation

Le VetMAX™ M. paratuberculosis 2.0 Kit se présente sous la forme d'un coffret contenant les différents réactifs pour la détection en duplex de *Mycobacterium paratuberculosis* et d'un contrôle interne IPC. À réception, le kit doit être conservé dans sa totalité entre **-30°C et -10°C**. Après première utilisation d'un composant, le conserver selon les recommandations suivantes :

Article	Description	Volume (100 réactions)	Conservation	
			A réception	Après première utilisation
1 - Séquences MPTSA (Tube vert)	Pool de séquences (primers et sondes). Il contient : • Le système de détection pour la cible <i>M. paratuberculosis</i> , comprenant une sonde TaqMan® marquée FAM™ - NFQ (Non-Fluorescent Quencher). • Le système de détection pour l'IPC, comprenant une sonde TaqMan® marquée VIC™ - TAMRA™ .	2 × 100 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
2 - Master Mix MPTSA (Tube blanc)	Mix pour PCR temps réel TaqMan®. Il contient le buffer et l'enzyme de PCR temps réel.	2 × 625 µL	-30°C à -10°C	2°C à 8°C
4a - EPC MPTSA (Tube marron)	External Positive Control : Contrôle positif en <i>M. paratuberculosis</i> . Il s'agit d'acides nucléiques déjà extraits à amplifier lors de la PCR temps réel.	2 × 90 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
5 - IPC MPTSA (Tube jaune)	Internal Positive Control : Contrôle interne exogène, à ajouter dans chaque échantillon et chaque témoin lors de l'étape de lyse de l'extraction.	500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C

Témoins d'extraction et d'amplification

Le **VetMAX™ M. paratuberculosis 2.0 Kit** contient 2 témoins permettant la validation de l'extraction et de l'amplification des ADN bactériens :

4a - EPC MPTSA : contrôle positif en *Mycobacterium paratuberculosis*

Contrôle positif **déjà extrait** à amplifier lors de la PCR temps réel.

Un résultat positif compris dans l'intervalle accepté de C_t permet de valider l'amplification de la cible *M. paratuberculosis* par PCR temps réel.

5 - IPC MPTSA : contrôle interne d'extraction

Contrôle positif à **ajouter dans chaque échantillon lors de l'étape de lyse** de l'extraction des acides nucléiques.

Un résultat IPC positif avec une valeur comprise dans l'intervalle accepté de C_t dans un échantillon permet de valider l'extraction de cet échantillon qu'il soit positif ou négatif pour le pathogène recherché : élimination des faux négatifs et vérification de l'effet des inhibiteurs.

Il est recommandé de réaliser deux contrôles négatifs pour valider le bon déroulement de l'analyse :

NCS : contrôle négatif d'extraction

C'est un témoin composé des réactifs utilisés lors de l'extraction, sans ajout d'échantillon (le volume d'échantillon peut être remplacé par le tampon utilisé lors de la préparation des échantillons ou par de l'eau DNase/RNase-free), qui subit le même traitement que les échantillons : extraction des acides nucléiques (avec ajout d'IPC) puis PCR temps réel.

Un résultat négatif en *M. paratuberculosis* permet de valider l'absence de contamination au cours de l'extraction et de la PCR temps réel.

NC : contrôle négatif d'amplification

Il s'agit du mix d'amplification déposé dans la plaque au moment de la préparation de la PCR temps réel, complété de 5 µL d'eau DNase/RNase-free pour ajuster la réaction à 25 µL.

Un résultat négatif pour *M. paratuberculosis* et IPC permet de valider l'absence de contamination au cours de la préparation des réactions pour la PCR temps réel.

Matériel et réactifs requis pour la PCR temps réel non fournis dans le kit

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur thermofisher.com.

- Micropipettes de précision (gamme de 1 µL à 1000 µL) avec pointes DNase/RNase-free à filtre
- Eau DNase/RNase-free
- Tampon TE 1X
- Tampon PBS 1X
- Un thermocycleur de PCR temps réel capable de détecter les fluorophores suivants :
 - FAM™ (maximum d'émission : 515 nm)
 - VIC™ (maximum d'émission : 554 nm)
- Consommables de qualité optique compatibles avec le thermocycleur utilisé : Plaques PCR 96 puits, barrettes PCR (8 ou 12 puits), microtubes ou capillaires; films ou bouchons adaptés à la fermeture

Procédure d'analyse

Le volume réactionnel de la PCR temps réel est de 25 µL :

- **Mix MPTSA** : 20 µL par analyse. A reconstituer extemporanément avant la PCR temps réel.
- **ADN extrait** : 5 µL par analyse.

Extraction des ADN bactériens

Il est nécessaire d'isoler les ADN à partir des échantillons pour l'analyse par PCR temps réel.

Ajouter **5 µL** de **5 - IPC MPTSA** par échantillon à extraire et au **NCS** lors de l'étape de lyse de l'extraction des acides nucléiques.

NOTE : Pour connaître des méthodes d'extractions compatibles et validées avec le **VetMAX™ M. paratuberculosis 2.0 Kit** merci de contacter le Support Technique.

Reconstitution du mix réactionnel

Reconstituer le **Mix MPTSA** juste avant emploi, dans une pièce dédiée à la préparation des mix :

1. A la première utilisation, décongeler le tube de **2 - Master Mix MPTSA** entre **2°C et 8°C**, **sur glace** ou sur un portoir réfrigérant. Le conserver et maintenir entre **2°C et 8°C** à chaque utilisation suivante.
2. Décongeler le tube de **1 - Sequences MPTSA** à température ambiante. Le replacer entre **-30°C et -10°C** après utilisation.
3. Reconstituer entre **2°C et 8°C**, **sur glace** ou sur un portoir réfrigérant, le mix réactionnel **Mix MPTSA** selon les tables de calcul suivantes :

Composant	Pour 1 réaction	Pour N réactions ⁽¹⁾
1 - Sequences MPTSA	2 µL	N × 2 µL
2 - Master Mix MPTSA	12.5 µL	N × 12.5 µL
Eau RNase/DNase-free	5.5 µL	N × 5.5 µL
Volume total	20 µL	N × 20 µL

⁽¹⁾ Il est recommandé de prévoir une réaction supplémentaire par rapport au total de réactions qui seront réalisées lors des analyses (échantillons + contrôles). Ne jamais mélanger les réactifs issus de lots de kits différents (se référer au Certificat d'Analyse).

- Après reconstitution, procéder immédiatement à la PCR temps réel. Maintenir le tube de **Mix MPTSA** entre **2°C et 8°C**, sur glace ou sur un portoir réfrigérant jusqu'à utilisation.

Préparation de la PCR temps réel

- Créer un plan d'analyse pour la distribution des mix et échantillons. Éloigner si possible le contrôle positif (EPC) des autres échantillons.
- Homogénéiser le tube **Mix MPTSA** par agitation douce, puis centrifuger brièvement.
- Distribuer **20 µL de Mix MPTSA** par puits de la plaque PCR, barrette PCR ou capillaire utilisé.
- Ajouter les ADN des échantillons et contrôles au mix réactionnel, selon le plan d'analyse prédéfini :

Type d'analyse	Composant	Volume d'échantillon
Echantillon pour analyse	ADN extraits de l'échantillon	5 µL
Contrôle positif d'amplification	4a - EPC MPTSA	5 µL
Contrôle négatif d'extraction (NCS)	NCS extrait	5 µL
Contrôle négatif d'amplification (NC)	Eau DNase/RNase-free	5 µL

- Fermer la plaque PCR, les barrettes PCR ou les capillaires avec un film adhésif ou des bouchons adaptés.

Amplification par PCR en temps réel

- Créer les détecteurs suivants sur le thermocycleur :

	Reporter	Quencher
MPTSA	FAM™	NFQ (Non-Fluorescent Quencher)
IPC MPTSA	VIC™	TAMRA™ ⁽¹⁾
Référence passive : ROX™ ⁽¹⁾		

⁽¹⁾ Les fluorophores TAMRA™ et ROX™ sont à renseigner obligatoirement pour l'analyse par PCR temps réel si le thermocycleur est capable de les détecter. Pour les autres thermocycleurs, l'absence de détection de ces fluorophores ne remet pas en cause l'analyse par PCR temps réel.

- Attribuer pour chaque échantillon le détecteur **MPTSA** et le détecteur **IPC MPTSA** dans le puits utilisé pour l'analyse.
- Créer le programme de PCR temps réel suivant pour l'analyse :

	Répétitions de l'étape	Température	Durée
Etape 1	×1	50°C	2 minutes
Etape 2	×1	95°C	10 minutes
Etape 3	×45	95°C	15 secondes
		60°C ⁽¹⁾	1 minute

⁽¹⁾ Collecte des données de fluorescence durant la phase 60°C – 1 minute.

- Placer la plaque PCR, les barrettes PCR ou les capillaires dans le thermocycleur et démarrer la PCR temps réel.

Analyse des résultats

Analyse des données brutes

Se référer aux recommandations du fournisseur du thermocycleur pour l'analyse des données brutes.

- Placer les lignes seuils (threshold) de manière indépendante pour chaque cible de la PCR temps réel.
- Interpréter les résultats en fonction des valeurs de C_t obtenues pour les échantillons pour chaque détecteur selon les recommandations ci-après.

Validation du test

La validation du test passe par l'acceptation des critères suivants :

	Détecteur MPTSA	Détecteur IPC MPTSA	Validation
EPC MPTSA	$C_t = C_{t\text{ac MPT de 4a-EPC MPTSA}} \pm 3C_t^{(1)}$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45^{(2)}$	PCR validée
NCS	$C_t > 45$	$C_t = C_{t\text{ac IPC de 5-IPC MPTSA}} \pm 3C_t^{(3)}$	Extraction validée
NC	$C_t > 45$	$C_t > 45$	Réactifs PCR validés

⁽¹⁾ Se référer aux valeurs indiquées dans le paragraphe 2.1 « EPC » du Certificat d'Analyse du lot utilisé pour l'essai.

⁽²⁾ Ne pas prendre en compte la valeur d'IPC dans l'EPC pour la validation du test.

⁽³⁾ Se référer aux valeurs indiquées dans le paragraphe 2.2 « IPC » du Certificat d'Analyse du lot utilisé pour l'essai.

Interprétation des résultats

Pour chaque échantillon analysé, interpréter les résultats comme décrit ci-dessous :

Détecteur MPTSA	Détecteur IPC MPTSA	Interprétation
$C_t < 45$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45$	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> détecté
$C_t > 45$	$C_t \leq C_t \text{ IPC du NCS} + 3C_t^{(1)}$	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> non détecté
$C_t > 45$	$C_t > C_t \text{ IPC du NCS} + 3C_t^{(1)}$	Non validé ⁽²⁾

⁽¹⁾ Se référer à la valeur de C_t IPC obtenue pour le NCS réalisé lors d'une même série d'extraction que les échantillons à analyser. La valeur du C_t IPC obtenue pour ce NCS doit préalablement être validée comme décrit précédemment.

⁽²⁾ L'échantillon sera rendu comme non validé en raison de la valeur non conforme de l'IPC.

Conduite à tenir pour les échantillons non validés

1. Diluer l'ADN de l'échantillon non validé au 1:10 en tampon TE 1X.
2. Faire une nouvelle analyse PCR sur 5 µL de cette dilution.
3. Si l'ADN dilué est positif en *M. paratuberculosis* ou négatif en *M. paratuberculosis* avec un résultat IPC conforme, le résultat obtenu est alors validé.
4. Si l'ADN dilué est négatif en *M. paratuberculosis* avec un résultat IPC non conforme, le résultat obtenu est toujours non validé. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon en le pré-diluant au 1:10 dans du tampon PBS 1X avant extraction.
5. Si le résultat est toujours non validé, répéter l'analyse sur un nouveau prélèvement.

Documentation et support

Service clientèle et assistance technique

Support technique : rendez-vous sur thermofisher.com/askaquestion

Visiter thermofisher.com/support pour avoir accès aux dernières nouveautés relatives aux services et à l'assistance technique, notamment :

- Numéros de téléphone partout dans le monde
- Commande et Support web
- Guides de l'utilisateur, manuels et protocoles
- Certificats d'analyse
- Fiches de Données de Sécurité (FDS, également appelées FS (Fiches Signalétiques))

Remarque : Pour les FDS relatives aux réactifs et aux produits chimiques d'autres fabricants, contacter chaque fabricant.

Garantie produit limitée

Life Technologies Corporation et ses filiales garantissent leurs produits selon les termes et conditions générales de ventes disponibles sur le site www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions. Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : thermofisher.com/support.

 Laboratoire Service International (LSI) | 6 Allée des Écureuils | Parc Tertiaire du Bois-Dieu | 69380 Lissieu, France

Les informations contenues dans ce guide sont susceptibles d'être modifiées sans préavis.

CLAUSE DE NON-RESPONSABILITÉ : DANS LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, LIFE TECHNOLOGIES ET/OU SA OU SES FILIALE(S) NE SAURAIENT ÊTRE TENUES RESPONSABLES DE DOMMAGES SPÉCIAUX, ACCESSOIRES, INDIRECTS, PUNITIFS, MULTIPLES OU CONSÉCUTIFS LIÉS AU PRÉSENT DOCUMENT OU A SON USAGE OU EN RÉSULTANT.

Historique des révisions : Pub. N° MAN0007609 (français)

Révision	Date	Description
B.0	24 mai 2017	Mise à jour sur le modèle du document en cours, avec mises à jour associées à la garantie, aux marques et aux logos.
A.0	13 novembre 2013	Base de référence pour l'historique de révision

Licence à Usage Limité N° 460 : Diagnostic vétérinaire PCR. Avis aux acheteurs : destiné à des services de diagnostic vétérinaire, notamment l'établissement de rapports de diagnostic payants et pour les besoins de la recherche uniquement. Le diagnostic chez l'homme nécessite une licence séparée de Roche.

©2017 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques sont la propriété de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales, sauf indication contraire. TaqMan est une marque déposée de Roche, utilisée sous autorisation et licence.