

VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit

PCR temps réel TaqMan® pour la détection multiplex des 8 majeurs pathogènes responsables des avortements chez les ruminants (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter fetus*, *Leptospira* pathogènes, *Anaplasma phagocytophila* et Bovine Herpes Virus type 4)

Référence Catalogue SARP

Partie N° 100020440 Pub. N° MAN0008871 Rév. B.0

Technique	Espèce(s)	Acides nucléiques isolés à partir des matrices	Test
PCR temps réel (ADN) - 2 Duplex et 6 Simplex - IPC endogène	Ruminants	Écouvillons placentaires, vaginaux et cervicaux	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™ Ruminant Abortion Screening Kit est un outil de diagnostic moléculaire permettant la détection des principaux agents responsables d'avortements chez les ruminants (*Coxiella burnetii*, *Chlamydophila* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter fetus*, et *Leptospira* pathogènes, *Anaplasma phagocytophila* et Bovine Herpes Virus type 4) par la méthode de PCR en temps réel.

Chaque échantillon d'ADN obtenu après extraction est analysé dans 8 puits indépendants : chaque puits est utilisé pour la détection spécifique de l'ADN du pathogène d'intérêt 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 extraits à partir d'écouvillons **placentaires, vaginaux et cervicaux**.

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

Réactifs du kit et conservation

Le VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit se présente sous la forme d'un coffret contenant les différents réactifs pour la détection en duplex des 8 pathogènes 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 (25 réactions)	Conservation	
			A réception	Après première utilisation
3 - Mix SAR Cox b. (Tube rouge)	2 Mix pour PCR TaqMan®. Contiennent : • Le système de détection pour le pathogène cible, comprenant une sonde TaqMan® marquée FAM™ - NFAQ (Non-Fluorescent Quencher) ou FAM™ - TAMRA™. • Le système de détection pour l'IPC, comprenant une sonde TaqMan® marquée VIC™ - TAMRA™. • Le tampon et l'enzyme de PCR temps réel.	500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR Chlam (Tube orange)		500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR ANAP (Tube jaune)	6 Mix pour PCR TaqMan®. Contiennent : • Le système de détection pour le pathogène cible, comprenant une sonde TaqMan® marquée FAM™ - NFAQ (Non-Fluorescent Quencher). • Le tampon et l'enzyme de PCR temps réel.	500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR BHV4 (Tube vert)		500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR C. fetus (Tube bleu)		500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR Lepto (Tube violet)		500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR Listeria (Tube blanc)		500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
3 - Mix SAR Salmo (Tube noir)		500 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C
4a - EPC SARP (Tube marron)	External Positive Control : Contrôle positif pour les 8 pathogènes. Il s'agit d'acides nucléiques déjà extraits à amplifier lors de la PCR temps réel.	360 µL	-30°C à -10°C	-30°C à -10°C

Témoins d'extraction et d'amplification

Le VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit contient 1 témoin permettant la validation de l'amplification des ADN:

4a - EPC SARP : contrôle positif en pathogènes cibles

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 du pathogène cible par PCR temps réel.

La validation de l'extraction des acides nucléiques pour chaque échantillon s'effectue grâce à la détection d'un **IPC endogène** (Internal Positive Control), **présent dans chaque échantillon**.

Un résultat IPC positif avec une valeur conforme 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 puis PCR temps réel.

Un résultat négatif en pathogène cible et en IPC endogène 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 le pathogène cible 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 :

- 3 - Mix SAR pathogène : 20 µL par analyse
- ADN extrait : 5 µL par analyse et par mix

Extraction des ADN

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

NOTE : Pour connaître des méthodes d'extractions compatibles et validées avec le VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit, merci de contacter le Support Technique.

Préparation de la PCR temps réel

1. Créer un plan d'analyse pour la distribution des mix et échantillons. Éloigner si possible le contrôle positif (EPC) des autres échantillons.
2. Pour chaque mix utilisé pour l'analyse :
 - a. Décongeler le tube 3 - **Mix SAR pathogène** entre 2°C et 8°C, **sur glace** ou sur un portoir réfrigérant.
 - b. Homogénéiser le tube 3 - **Mix SAR pathogène** par agitation douce, puis centrifuger brièvement.
 - c. Distribuer **20 µL de 3 - Mix SAR pathogène** par puits de la plaque PCR, barrette PCR ou capillaire utilisé.

3. Ajouter les ADN des échantillons et contrôles à chaque 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 SARP	5 µL
Contrôle négatif d'extraction (NCS)	NCS extrait	5 µL
Contrôle négatif d'amplification (NC)	Eau DNase/RNase-free	5 µL

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

Amplification par PCR en temps réel

1. Créer les 9 détecteurs suivants sur le thermocycleur :

	Reporter	Quencher
COXB	FAM™	TAMRA™ ⁽¹⁾
CHL, LIST, SALM, CF, ANAP, BHV4, LEPT	FAM™	NFQ (Non-Fluorescent Quencher)
IPC SARP	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.

2. Attribuer pour chaque échantillon le détecteur du pathogène **correspondant** et si le mix détecte un IPC, le détecteur **IPC SAR** dans le puits utilisé pour l'analyse.
3. 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.

4. 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 Pathogène	Détecteur IPC SAR (pour les mix détectant l'IPC)	Validation
EPC SARP	$C_t = C_{t\text{ oc SAR de 4a- EPC SARP}} \pm 3C_t^{(1)}$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45^{(2)}$	PCR validée
NCS	$C_t > 45$	$C_t > 45$	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.

Interprétation des résultats

Pour chaque échantillon analysé, interpréter les résultats comme décrit ci-dessous. Pour les mix ne détectant pas d'IPC, se référer à la valeur de C_t IPC obtenue avec les mix détectant l'IPC.

Détecteur Pathogène	Détecteur IPC SARP	Interprétation
$C_t < 45$	$C_t < 45$ ou $C_t > 45$	Pathogène cible détecté
$C_t > 45$	$C_t < 45$	Pathogène cible non détecté
$C_t > 45$	$C_t > 45$	Non validé ⁽¹⁾

⁽¹⁾ L'échantillon sera rendu comme non validé en raison de la négativité 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 pathogène cible ou négatif en pathogène cible avec un résultat IPC conforme, le résultat obtenu est alors validé.
4. Si l'ADN dilué est négatif en pathogène cible 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° MAN0008871 (français)

Révision	Date	Description
B.0	22 juillet 2019	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	25 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.

©2019 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.