

# VetMAX™ M. tuberculosis Complex Kit

Détection des mycobactéries responsables de la tuberculose bovine par PCR temps réel

Référence catalogue MTBC

N° de document 100041123 Pub. n° MAN0015858 Rév. B.0

Technique	Espèces	Matrices d'échantillons	Type de test
PCR temps réel (ADN) <ul style="list-style-type: none"> <li>Analyses en duplex</li> <li>IPC exogène</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bovin</li> <li>Blaireau</li> <li>Sanglier</li> <li>Cervidé</li> </ul>	Nœud lymphatique et tissus lésionés (sans le caséum, la peau et la couche adipeuse)	Individuel

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

## Description du produit

Le VetMAX™ M. tuberculosis Complex Kit permet la détection par PCR temps réel du complexe de *Mycobacterium tuberculosis*, un groupe de mycobactéries liées génétiquement qui peut être à l'origine de la tuberculose chez le bovin et d'autres espèces. L'analyse cible la séquence d'insertion *IS6110* présente dans les génomes de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae* et *M. pinnipedii*.

Le kit a été validé pour une utilisation sur de l'ADN extrait des nœuds lymphatiques et des tissus lésionés chez le bovin, le blaireau, le sanglier et les espèces de cervidés. Un rapport de validation est disponible sur demande auprès de votre représentant commercial ou votre technico-commercial. Le client est responsable de la validation du kit avec des tissus non inclus dans le rapport.

Le kit fournit les essais et les réactifs nécessaires pour une PCR temps réel monopuits au cours de laquelle les cibles du complexe de *M. tuberculosis* et du contrôle positif interne (IPC) sont amplifiées et détectées grâce à une sonde d'hydrolyse. Dans ce document, le terme *TUB* est utilisé pour désigner la séquence cible *IS6110* indiquant la présence des organismes du complexe de *M. tuberculosis*. Le kit comprend :

- 3 – Mix MTBC : Contient des amorces, des sondes, un tampon et une enzyme pour une amplification optimisée des cibles *TUB* et IPC par PCR temps réel duplex.
- 4a – EPC MTBC : Matrice d'ADN quantifiée (voir le certificat d'analyse) contenant la séquence cible du complexe de *M. tuberculosis* (contrôle positif externe). Elle sert de contrôle positif pour les composants de la PCR temps réel et est utilisée pour définir les critères de validation des résultats des tests.
- 5 – IPC MTBC : Ajouté à chaque échantillon de test et de contrôle à l'étape suivant la lyse de la procédure d'extraction de l'ADN (IPC exogène). Il sert de contrôle pour la procédure d'extraction de l'ADN et permet d'évaluer la présence d'inhibiteurs de la PCR.

## Contenu et conservation

Composant	Quantité	Conservation
3 – Mix MTBC	2 × 500 µl	-30°C à -10°C
4a – EPC MTBC	2 × 90 µl	
5 – IPC MTBC	1 × 550 µl	

## Matériels requis non fournis

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur [thermofisher.com](http://thermofisher.com). « PFL » indique que le matériel est disponible sur [fisherscientific.com](http://fisherscientific.com) ou auprès d'un autre principal fournisseur de laboratoire. Les références catalogue qui s'affichent sous forme de liens ouvrent les pages Web de ces produits.

Élément	Source
<b>Instrument de PCR temps réel, parmi les suivants :</b>	
Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System <ul style="list-style-type: none"> <li>Precision Plate Holder for 7500 Real-Time PCR Systems (A24820)</li> <li>Precision Plate Holder for 0.2 mL Tubes and Strips (4367033)</li> </ul>	Contacter un représentant local.
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System <ul style="list-style-type: none"> <li>Precision Plate Holder for 7500 Fast Real-Time PCR Systems (4359652)</li> <li>7500 Fast Precision Plate Holder, for 0.1 mL Tube Strips (A29252)</li> </ul>	
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	
<b>Équipement</b>	
Pipettes sans nucléase	PFL
Deux bacs de glace ou portoirs réfrigérants : <ul style="list-style-type: none"> <li>Un pour la zone de configuration de la PCR dans laquelle le master mix PCR est préparé</li> <li>Un pour la zone dans laquelle les échantillons d'ADN et les contrôles sont préparés</li> </ul>	PFL
<b>Tubes, plaques et autres consommables</b>	
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	4316813
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971
MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip, 0.2 mL	4316567
MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	4323032
<b>Réactifs</b>	
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) (eau exempte de nucléases (non traitée au DEPC))	AM9939
TE Buffer 1X	PFL
<b>Autres consommables</b>	
Tubes à réactifs sans nucléase pour préparer les mélanges réactionnels	PFL
Embouts de pipette résistants aux aérosols	PFL

## Précaution d'emploi

- Pour chaque série de PCR temps réel, inclure les contrôles suivants :
  - Contrôle positif – utiliser 4a – EPC MTBC.

- Contrôle d'extraction — utiliser au moins 1 échantillon témoin préparé au cours de la même procédure d'extraction de l'ADN que celle des échantillons à analyser.
- Contrôle sans acide nucléique (NTC) — utiliser de l'eau nuclease-free.
- Respecter les "Bonnes pratiques de laboratoire pour la PCR et la RT-PCR" en page 3 pour éviter les faux positifs et la contamination des échantillons par des produits de PCR.

## Exigences concernant l'ADN

**Tableau 1** Recommandations pour l'extraction de l'ADN

Étape, processus ou paramètre	Recommandation
Quantité de matériel de départ pour l'extraction de l'ADN	Exciser de 2 g à 5 g de tissu présentant si possible des lésions typiques de la tuberculose.
Méthode d'extraction de l'ADN	Les méthodes validées pour une utilisation avec le VetMAX™ M. tuberculosis Complex Kit sont disponibles sur demande auprès du support technique.
Modification de la méthode d'extraction de l'ADN pour les échantillons testés et l'échantillon témoin	Ajouter 5 µl de 5 - IPC MTBC après la lyse lors de l'extraction de l'ADN.
Préparation de l'échantillon témoin pour une utilisation dans une PCR de contrôle d'extraction	Préparer au moins 1 échantillon témoin, à l'aide d'eau sans nucléase comme matériel de départ. Traiter l'échantillon témoin au cours de la même procédure d'extraction de l'ADN que les échantillons testés.

## Avant de commencer

- Décongeler réactifs et échantillons :
  - Décongeler 3 – Mix MTBC dans un bac de glace ou un portoir réfrigérant.
  - Décongeler 4a – EPC MTBC, 5 – IPC MTBC, et les échantillons d'ADN dans un bac de glace ou un portoir réfrigérant différent.
- Bien mélanger le contenu de chaque tube en le vortexant, puis centrifuger brièvement.

Stocker les réactifs et les échantillons décongelés à 5±3°C jusqu'à utilisation.

## Préparer les réactions de PCR

- Distribuer 10 µl de 3 – Mix MTBC dans le nombre approprié de puits de plaque ou de tubes.
- Ajouter le composant indiqué pour chaque type de réaction.

Type de réaction	Composant	Volume par réaction
Échantillon à analyser	Échantillon d'ADN	5,0 µl
Contrôle positif	4a – EPC MTBC	5,0 µl
Contrôle d'extraction	Échantillon témoin	5,0 µl
Contrôle sans acide nucléique (NTC)	Eau sans nucléase	5,0 µl

- Sceller chaque plaque ou tube, mélanger, puis centrifuger brièvement pour amener le contenu au fond des puits de plaque ou des tubes.

## Consignes pour l'analyse des données

- Suivez le guide d'utilisation de l'instrument pour l'analyse des données brutes.
- Fixer les seuils pour chaque cible séparément.
- Voir le Certificat d'analyse du lot de kit pour valider la série et interpréter les résultats.

## Configurer et démarrer l'instrument PCR temps réel

- En suivant les instructions du fabricant, configurer le test de PCR temps réel à l'aide des paramètres suivants.
  - Volume réactionnel : 15 µl
  - Référence passive : Fluorophore ROX™ (inclus dans le 3 – Mix MTBC)

**Remarque :** Le fluorophore ROX™ doit être sélectionné si l'instrument est capable de le détecter. Les instruments de PCR temps réel qui ne détectent pas le fluorophore ROX™ peuvent être utilisés sans conséquence sur l'exactitude des lectures.

- Programme du thermocycleur :

**Tableau 2** Programme du thermocycleur : mode standard ou rapide

Phase	Répétitions	Température	Durée
1	1	50°C	2 minutes
2	1	95°C	5 minutes
3	40	95°C	10 secondes
		60°C	30 secondes <sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup> Si votre thermocycleur ne peut pas être programmé à 30 secondes, la phase 3 à 60°C (l'étape d'élongation) peut être prolongée de 1 à 3 secondes.

- Sélectionner ou créer des détecteurs de fluorophores, puis les assigner à chaque tube ou puits.

Cible	Reporter	Quencher
TUB <sup>[1]</sup>	Fluorophore FAM™	Quencher non fluorescent (NFK)
IPC <sup>[1]</sup>	Fluorophore VIC™	

<sup>[1]</sup> TUB : cible du complexe de *M. tuberculosis*. IPC : cible du 5 – IPC MTBC.

- Lancer le programme de thermocycleur approprié, avec collecte des données d'amplification en temps réel au cours de la phase 3.

## Critères de validation

Se référer aux valeurs  $C_{TQC}$  dans le Certificat d'Analyse du lot de fabrication du kit. Le test est validé si les critères suivants sont respectés :

Type de réaction	Cible TUB (FAM™)	Cible IPC (VIC™)	Interprétation
Contrôle positif	$C_t = C_{TQC} \text{ TUB} \pm 3 C_t^{[1]}$	N/A <sup>[2]</sup>	La PCR est validée.
Contrôle d'extraction	$C_t > 40$	$C_t = C_{TQC} \text{ IPC} \pm 4 C_t^{[3]}$	L'extraction de l'ADN est validée.
Contrôle sans acide nucléique	$C_t > 40$	$C_t > 40$	Les réactifs PCR sont validés.

<sup>[1]</sup> Voir le tableau EPC dans le certificat d'analyse.

<sup>[2]</sup> N/A : non applicable ; la valeur IPC  $C_t$  de la réaction de contrôle positif n'est pas utilisée pour la validation.

<sup>[3]</sup> Voir le tableau IPC dans le certificat d'analyse.

## Interprétation des résultats

Cible TUB (FAM™)	Cible IPC (VIC™)	Interprétation
$C_t < 40$	Toute valeur	Le complexe de <i>M. tuberculosis</i> est détecté.
$C_t > 40$	$C_t \leq C_t$ du contrôle d'extraction + 4 $C_t^{[1]}$	Le complexe de <i>M. tuberculosis</i> n'est pas détecté.
$C_t > 40$	$C_t > C_t$ du contrôle d'extraction + 4 $C_t^{[1]}$	Résultat non validé.

<sup>[1]</sup> Le  $C_t$  du contrôle d'extraction doit être validé comme décrit dans "Critères de validation" en page 3.

## Tester à nouveau les échantillons dont les résultats ne sont pas validés

1. Diluer les échantillons d'ADN au 1:10 dans du tampon TE 1X.
2. Recommencer la procédure de PCR temps réel avec 5  $\mu\text{L}$  de l'ADN dilué, puis interpréter les résultats comme suit.

Résultat	Interprétation
L'ADN dilué est positif pour le complexe de <i>M. tuberculosis</i> .	Le résultat est validé.
L'ADN dilué est négatif pour le complexe de <i>M. tuberculosis</i> , et le résultat IPC est conforme.	
L'ADN dilué est négatif pour le complexe de <i>M. tuberculosis</i> , mais le résultat IPC est non-conforme.	Le résultat n'est pas validé.

3. Pour des échantillons dilués dont les résultats ne sont pas validés, recommencer la procédure d'extraction de l'ADN avec un nouvel aliquot du lysat de l'échantillon d'origine.

## Bonnes pratiques de laboratoire pour la PCR et la RT-PCR

- Porter des gants et une blouse de laboratoire propres.
  - Ne pas porter les mêmes gants et la même blouse que ceux précédemment portés pour manipuler des produits amplifiés ou préparer des échantillons.
- Changer systématiquement de gants en cas de doute quant à leur contamination possible.
- Maintenir des zones distinctes ainsi que des équipements et des fournitures dédiés pour les étapes suivantes :
  - Préparation des échantillons et configuration de la réaction.
  - Amplification et analyse des produits.
- Ne pas introduire les produits amplifiés dans la zone pré-PCR de la réaction.
- Ouvrir et fermer tous les tubes d'échantillon avec soin. Éviter toute projection ou création d'aérosols.
- Maintenir les composants et les réactifs fermés dans la mesure du possible.
- Utiliser une pipette à piston ou des embouts de pipette résistant aux aérosols.
- Nettoyer régulièrement les paillasses et équipements de laboratoire avec une solution d'eau de Javel à 10 % ou une solution de décontamination ADN.

## Garantie limitée du produit

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.html](http://www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html). Si vous avez des questions, vous pouvez prendre contact avec Life Technologies à l'adresse web suivante : [www.thermofisher.com/support](http://www.thermofisher.com/support).



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

CLAUSE DE NON-RESPONSABILITÉ: DANS LA MESURE PERMISE PAR LA LOI, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. ET/OU SA OU SES FILIALE(S) NE SAURAIENT ÊTRE TENUES POUR 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° MAN0015858

Révision	Date	Description
B.0	10 mai 2022	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ajout de la quantification du 4a – EPC MTBC à la description du produit ("Description du produit" en page 1).</li><li>• Mise à jour de la quantité de 3 – Mix MTBC et de 5 – IPC MTBC dans la section "Contenu et conservation" en page 1.</li><li>• Mise à jour du volume réactionnel et du programme du thermocycleur dans la section "Configurer et démarrer l'instrument PCR temps réel" en page 2.</li><li>• Ajout de l'Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System et du QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System aux matériels requis non fournis (voir "Matériels requis non fournis" en page 1).</li><li>• Des mises à jour mineures de la terminologie ont été effectuées dans tout le document.</li></ul>
A.0	23 mai 2017	Nouveau document traduit de l'anglais, publication numéro MAN0015857 Rév. B.0.

**Informations importantes sur les licences :** Ce produit peut être couvert par une ou plusieurs licences à usage limité. En utilisant ce produit, vous acceptez les conditions générales de toutes les licences à usage limité.

©2022 Thermo Fisher Scientific Inc. Tous droits réservés. Toutes les marques commerciales sont la propriété de Thermo Fisher Scientific et de ses filiales, sauf indication contraire.