



ADIAVET™ PARATB REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DE
MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*
PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

Référence :

ADI045-100 (100 réactions)



NOTE

Les fluorochromes présents dans ce produit sont vendus sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par des brevets, soit délivrés, soit en cours de demande, aux Etats Unis et dans le monde entier. La licence couvre le Diagnostic Moléculaire Vétérinaire.

Version française

NF045-10

2020/01

ADIAVET™ PARATB REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	2
II.	INFORMATIONS GENERALES	3
1.	But de l'essai	3
2.	Pathogène.....	3
3.	Description et principe du test.....	3
III.	MATERIEL ET REACTIFS.....	5
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	5
2.	Validité et conservation.....	5
3.	Utilisation des contrôles.....	5
A.	Utilisation de « EPC-Ext »	5
B.	Utilisation du « EPC-Amp » : (seulement dans le cas où l'« EPC-Ext » n'est pas utilisé).....	5
C.	Utilisation du témoin « PARATB CTL+ ».....	5
4.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit.....	5
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....	7
1.	Précautions.....	7
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ADN.....	7
3.	Extraction et purification recommandées.....	7
4.	Témoins à inclure	8
5.	Préparation des échantillons	9
A.	Fèces.....	9
B.	Tissu.....	9
C.	Lait	9
D.	Culture.....	9
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION.....	10
1.	Traitement des fèces AVEC ou SANS l'ADIAFILTER.....	10
A.	Préparation de l'échantillon AVEC l'utilisation de l'ADIAFILTER :.....	10
B.	Préparation de l'échantillon SANS l'utilisation de l'ADIAFILTER :.....	10
2.	Avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit.....	11
3.	Avec le kit NucleoSpin® Tissue.....	12
4.	Avec le kit NucleoSpin® 96 Tissue avec centrifugation	13
5.	Avec le kit ADIAMAG.....	13
6.	Avec le kit ADIAPURE™ PURIFICATION.....	13
VI.	AMPLIFICATION.....	14
VII.	LECTURE ET INTERPRETATION DES RESULTATS.....	15
1.	Définitions.....	15
2.	Validation et interprétation des résultats.....	15
A.	Validation de l'essai.....	15
B.	Interprétation des résultats.....	16
VIII.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	17
IX.	INDEX DES SYMBOLES.....	18

I. Historique des révisions

N/A	Non Applicable (première publication)
Correction	Correction des anomalies du document
Modification technique	Addition, révision et/ou suppression d'information liée au produit
Administratif	Modifications non techniques notables pour l'utilisateur

NB : toute modification mineure, typographique, grammaticale et de mise en page ne figurent pas dans l'historique des révisions.

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2013/07	NF045-06	Modification technique	Ajout d'information relative au protocole d'utilisation, avec et sans, l'ADIAFILTER, en page 9, § V-1.
2014/12	NF045-07	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 17.
2014/12	NF045-07	Modification technique	Suppression de la référence ADI045-50 (50 réactions)
2016/07	NF045-08	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF045-08	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF045-08	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §I.3
2016/07	NF045-08	Modification technique	Suppression protocole sur le QIAextractor DX
2018/09	NF045-09	Modification technique	Suppression des références ADIAPURE GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, réf ADIADPB11-192 et ADIADPB11-480) Suppression de la référence ADIAPURE PURIFICATION 192 tests (Bio-X Diagnostics, réf ADIADP001-192)
2020/01	NF045-10	Modification technique	Ajout d'un tube d'eau dans le kit Modification kit billes magnétiques par kit ADIAMAG
2020/01	NF045-10	Administratif	Modification §III.4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ PARATB REAL TIME permet de détecter *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (PARATB) par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir de prélèvements de fèces, de tissu et de lait de bovin, d'ovin et de caprin, ainsi qu'à partir de prélèvement environnemental et de culture bactérienne.

2. Pathogène

Décrite dès 1826, la paratuberculose bovine est une entérite qui se traduit par une diarrhée chronique puis persistante, des baisses du niveau de production (lait, fécondité) et l'amaigrissement progressif des animaux jusqu'à la mort. En 1898, John et Frothingham notent la présence de nombreux bacilles acido-alcool-résistants dans la muqueuse intestinale des bovins malades. Ces bacilles, semblables à ceux de la tuberculose, sont responsables d'un épaissement spécifique de la muqueuse intestinale correspondant à une forme particulière d'entérite qui sera appelée paratuberculose ou maladie de John et dont l'agent étiologique est *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (Thorel *et al.*, 1990). La maladie a une incubation lente entre 2 et 5 ans, ainsi la majorité des animaux atteints présente des symptômes à l'âge de 2 à 7 ans.

La contamination des animaux se fait par voie orale. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*, ou bacille de John, colonise la région jéjuno-iléale. Le niveau de contamination des matières fécales évolue en fonction du stade de la maladie, de quelques bactéries par gramme de fèces en début d'expression chronique, jusqu'à 10^4 à 10^{10} en phase clinique (Collins *et al.*, 1993). Cette bactérie peut ensuite être disséminée dans l'organisme de l'animal par l'intermédiaire des macrophages ; des contaminations par le colostrum, le lait et le sperme sont alors possibles.

La mise en évidence de *M. paratuberculosis* par culture est longue (6 à 8 semaines) et la mise en évidence des anticorps circulants manque de sensibilité.

En 1985, une équipe de chercheurs du St George's Hospital de Londres dirigée par le professeur J. Hermon-Taylor, identifie un fragment génomique nommé IS900, spécifique des souches de *M. paratuberculosis* (Green *et al.*, 1990). Depuis de nombreuses équipes ont pu confirmer la parfaite spécificité de ce fragment d'ADN en l'utilisant comme outil de diagnostic en particulier dans des tests PCR (Guillou *et al.*, 1993).

3. Description et principe du test

Ce test repose sur l'amplification enzymatique de gène ou technique PCR. Il utilise des amorces et une sonde marquée FAM spécifique de *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (IS900).

Selon le protocole d'extraction et de purification, 2 solutions sont possibles pour le contrôle interne

- un contrôle positif externe d'extraction appelé **EPC-Ext**, il est ajouté pendant l'extraction et suit toutes les étapes du processus d'extraction
- un contrôle positif externe d'amplification appelé **EPC- Amp**, il est ajouté dans le réactif PCR et contrôle la non-inhibition de la réaction d'amplification.

Ces contrôles internes sont mis en évidence avec une sonde interne marquée avec un fluorophore lu dans le même spectre que VIC ou HEX.

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Fèces**	☒	10
Tissu (ganglion, muqueuse, valvule iléo-caecale)	☒	☒
Lait	☒	☒
Prélèvement environnemental (raclage de bouses, aire d'attente...)**	☒	10
Culture bactérienne	☒	☒

* Dépend de la situation épidémiologique et de la qualité de l'échantillon.

** Une concentration de l'échantillon à l'aide de l'ADIAFILTER (Bio-X Diagnostics, réf. ADIFIL100) est proposée pour augmenter le niveau de sensibilité et de reproductibilité de la méthode globale de détection (en particulier pour les échantillons faiblement positifs).

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF	ADI045-100	
A5		solution d'amplification
PARATB CTL+		contrôle positif <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
EPC-ext		Contrôle exogène non cible d'extraction
EPC-Amp		Contrôle exogène non cible d'amplification
NF-Water		Eau Nuclease free
		2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
		1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
		2 x 300 µl tubes à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
		1 x 100 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)
		1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

2. Validité et conservation

A réception, le kit doit être stocké à **<-15°C**.

Il est recommandé d'aliquoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongélations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Les réactifs temps réel sont sensibles à la lumière : les conserver à l'obscurité.

Le réactif « A5 » est prêt à être utilisé pour la réaction PCR.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Utilisation des contrôles

Selon le protocole d'extraction utiliser, l'**EPC-Ext** ou l'**EPC-Amp**.

A. Utilisation de « EPC-Ext »

Aliquoter et conserver cette solution à **<-15°C** en fonction de la taille des séries d'extraction.

Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

Pour chaque extraction, nous recommandons d'ajouter **5 µl « EPC-Ext »** par échantillon.

B. Utilisation du « EPC-Amp » : (seulement dans le cas où l'« EPC-Ext » n'est pas utilisé)

Aliquoter et conserver cette solution à **<-15°C** en fonction de la taille des séries de PCR. **Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.**

Pour chaque réaction PCR, nous recommandons d'ajouter **1 µl « EPC-Amp »** pour **20 µl** du « A5 ».

C. Utilisation du témoin « PARATB CTL+ »

« PARATB CTL+ » est un témoin positif d'amplification.

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « PARATB CTL+ » et vortexer au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à **<-15°C**.

Pour chaque analyse, utiliser 5 µl de « PARATB CTL+ » dans un des puits.

4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

Attention : le consommable utilisé doit être Nuclease-free ou autoclavé deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C.

- Un thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermées de qualité optique
- Une centrifugeuse pour microtubes
- Vibrobroyeur à billes (type Mixer Mill, Fast Prep, Ribolyser)
- Malaxer à pales avec sacs de broyage pour l'analyse des tissus
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Microtubes stériles de 1,5 ml et 2 ml
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Gants latex non poudrés

- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts (pointes) pour micropipettes (de préférence avec filtres)
- Eau déminéralisée stérile ou eau pour préparation injectable (PPI)
- Ethanol 96-100%
- Tubes de billes de broyage :
 - ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBIA-192 (192 tests), réf. ADIADPBIA-480 (480 tests)) uniquement pour le vibrobroyeur à billes de type Mixer Mill
 - Lysing Matrix B (MP biomedicals, 100 tubes, réf. 116911100) uniquement pour les vibrobroyeurs à billes de type Fast Prep ou Ribolyser
- PACK ADIAFILTER (Bio-X Diagnostics, réf. ADIFIL100)

Kit d'extraction d'ADN

- **Kit d'extraction en colonnes individuelles :**
 - QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)
 - NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL, 50 tests : réf. 740952.50 ou 250 tests : réf. 740952.250)
- **Kit d'extraction d'ADN en colonnes, format plaque 96 :**
 - ADIAPURE™ PURIFICATION (Bio-X Diagnostics, 480 tests : réf. ADIADP001-480)
 - ADIAPURE™ PARATB MILK (Bio-X Diagnostics, 100 tests : réf. ADIADP04M1-100)
 - NucleoSpin® 96 tissue (MACHEREY-NAGEL, 4*96 tests : réf. 740454.4)
- **Kit d'extraction d'ADN/ARN en billes magnétiques sur automate :**
 - ADIAMAG (Bio-X Diagnostics ; 200 extractions : réf. NADI003)

Kits complémentaires disponibles pour l'adoption de méthode et de PCR (U47-600) :

- ADIAVET™ PARATB Extraction Positive Control (Réf. : ADI045-8). Matériel de référence fournisseur pour adoption de méthode pouvant également être utilisé comme sentinelle.
- ADIAVET™ LDpcr Positive Control – PARATB (réf. : ADI045-LD) Confirmation des performances – LDpcr du kit ADIAVET™ PARATB REAL TIME.

IV. Traitement des échantillons et des témoins

Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.

1. Précautions

ADIAGENE a validé ce test avec les kits d'extraction d'ADN des sociétés Bio-X Diagnostics, Qiagen et Macherey-Nagel. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés avec une validation préalable.

Respecter les recommandations des fabricants pour la conservation, la préparation et l'utilisation des réactifs contenus dans les kits d'extraction.

Certains kits contiennent et/ou nécessitent l'utilisation de composés toxiques. Ces produits doivent être manipulés avec des gants et sous hotte chimique.

Nous recommandons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude et la précision des micropipettes utilisées. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire.

La réaction PCR génère de grandes quantités d'ADN amplifié. Quelques molécules de produits amplifiés peuvent générer des résultats positifs. Il est donc important de bien séparer la zone d'analyse des produits amplifiés de la zone où sont manipulés les échantillons à analyser et de ne pas ouvrir les tubes après amplification.

Les échantillons à analyser doivent être manipulés et éliminés comme des déchets biologiques. **Prendre toutes les dispositions de sécurité et de confinement requises pour la manipulation des agents biologiques concernés.**

Nous vous recommandons de faire des fractions aliquotées d'eau déminéralisée, de les autoclaver (25 minutes à +120°C) et de changer de tube d'eau lors de chaque manipulation afin d'éviter toute contamination.

2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN

Les échantillons se conservent un ou deux jours à +2/8°C. Au-delà de 2 jours, il est conseillé de les conserver à <-15°C.

Les ADN extraits sont des molécules sensibles. Les extraits d'ADN peuvent être stockés dès la fin de l'extraction à +2/8°C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

3. Extraction et purification recommandées

Echantillon	Fèces					Tissu	Lait	Culture
	1 to 10 gramme			1 gramme				
Nom du Kit	QIAamp® DNA mini Kit	NucleoSpin® Tissue	NucleoSpin® 96 Tissue	ADIAMAG	ADIAPURE™ PURIFICATION	QIAamp® DNA mini Kit	ADIAPURE™ PARATB MILK	/
Technologie	Colonne de silice	Colonne de silice	Colonne de silice	Billes magnétiques	Ultra-filtration	Colonne de silice	/	/
Format d'extraction	Individuel		96 puits	96 puits ou 15 places	96 puits	Individuel	Individuel	Individuel
EPC à ajouter	EPC-Ext				EPC-Amp			

4. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats.

Les témoins sont à inclure par série d'analyse. Une série est définie comme un ensemble d'échantillons pour lesquels chaque étape a été réalisée dans les mêmes conditions. L'utilisation des témoins suit les recommandations de la norme PCR Santé animale (AFNOR NF U47-600-1).

L'ensemble des étapes du processus analytique (extraction + amplification), quelles que soient les matrices, est validé grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit.

- « EPC-Ext » permet de vérifier les étapes d'extraction et d'amplification pour chaque échantillon.
- « EPC-Amp » permet de vérifier seulement l'étape d'amplification.
- Le témoin « PARATB CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés :

- **Témoin négatif d'extraction (obligatoire)**

Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, au moins un témoin négatif doit être intégré dans chaque série d'extraction, ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou 200 µl de tampon de dilution (par exemple du PBS 1X).

- **Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)**

Un témoin positif « cible » doit être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une suspension de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la LD_{METHODE}. Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

ADIAGENE peut fournir un témoin positif cible d'extraction constitué d'une culture bactérienne inactivée et lyophilisée, calibrée entre 1 et 100xLD méthode. (ADIAVET™ PARATB Extraction Positive Control Réf. : ADI045-8).

Ce témoin, ajouté à une matrice négative, peut être utilisé comme **sentinelle** ou après dilution, comme **NED fournisseur pour adopter la méthode**.

5. Préparation des échantillons

A. Fèces

Pour tous les protocoles décrits la quantité de matière fécale peut varier de 1 à 10 g de fèces (= X). Respecter le ratio poids/volume et diluer la quantité d'échantillon fécal avec 7 volumes d'eau déminéralisée stérile (dilution (w / v) 1/7), par exemple, 3 g dans 20 ml ou 6 g avec 40 ml ou 10 g à 70 ml.

Echantillons environnementaux (raclage de bouses, aire d'attente,...) sont traités comme des fèces. Prélever 3-10 g d'échantillon et faire la dilution dans de l'eau.

Echantillons biologiques	Fèces de bovin	Fèces de caprin et ovin
Mise en suspension	Peser X ±0,2 g de fèces dans un pot de coproculture puis ajouter l' eau déminéralisée stérile . Homogénéiser au moins 15 secondes. Laisser sédimenter 10 à 20 minutes.	Peser et écraser X ±0,2 g de fèces dans un pot de coproculture puis ajouter l' eau déminéralisée stérile . Une réhydratation toute la nuit à température ambiante est conseillée. Homogénéiser au moins 15 secondes. Laisser sédimenter 10 à 20 minutes.

Une concentration à l'aide d'un dispositif spécial, ADIAFILTER est proposé pour augmenter la sensibilité et la reproductibilité. Une préparation des matières fécales sans la concentration avec ADIAFILTER est aussi proposée.

B. Tissu

Echantillons biologiques	Ganglions	Muqueuses et valvules iléo-caecales
Traitement de l'échantillon	Couper l'organe avec une lame de scalpel, et lacérer l'intérieur du ganglion de façon à obtenir environ 10+/- 0,5 g d'organe dans un sac de broyage contenant 40 ml d'eau déminéralisée stérile .	Gratter la paroi des muqueuses avec une lame de scalpel, de façon à obtenir environ 5 +/- 0,5 g d'organe dans un sac de broyage contenant 40 ml d'eau déminéralisée stérile .
	Broyer dans un malaxer à pales les sacs 1 à 2 minutes afin d'obtenir un broyat d'organe	

C. Lait

Se référer à la version de notice disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAPURE™ PARATB MILK utilisé.

D. Culture

Mettre **1 colonie** dans **50 µl d'eau déminéralisée stérile** avec anse stérile. Faire bouillir 10 minutes. Centrifuger 1 000 g à température ambiante. Transférer le surnageant dans un autre microtube. Boucher les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à -20°C +/-5°C.

V. Extraction et purification

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Après l'incubation et le broyage, centrifuger quelques secondes pour enlever les gouttes à l'intérieur du couvercle.

1. Traitement des fèces AVEC ou SANS l'ADIAFILTER

A. Préparation de l'échantillon AVEC l'utilisation de l'ADIAFILTER :

Echantillons biologiques :	Fèces de bovin	Fèces de caprin et ovin
Clarification et concentration	Déposer 10 ml de surnageant préparé dans le § IV 5-A sur l'ADIAFILTER. Centrifuger 5 minutes à 3 000 g. Éliminer le filtre et le surnageant. Remarque: le culot peut être conservé à +2/8°C une semaine avant extraction.	
Broyage	Ajouter 500 µl d'eau déminéralisée stérile sur le culot et homogénéiser jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Transvaser par renversement dans un microtube contenant 300 mg de billes de broyage . Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill*. Centrifuger 5 minutes à 15 000 g.	
Transfert	Transférer 200µl de surnageant dans le support approprié au protocole pour le QIAamp® DNA Mini Kit, NucleoSpin® Tissue et NucleoSpin® 96 Tissue. Transférer 100µl de surnageant dans le support approprié pour le kit ADIAMAG sur automate.	

* ou transférer la solution dans microtube Matrix B et broyer 3 x 45 secondes à 4 m/sec avec le Fast Prep.

B. Préparation de l'échantillon SANS l'utilisation de l'ADIAFILTER :

Echantillons biologiques :	Fèces de bovin	Fèces de caprin et ovin
Broyage	Transvaser 1ml de surnageant préparé dans le § IV 5-A dans un microtube contenant 300 mg de billes de broyage . Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill*. Centrifuger 5 minutes à 15 000 g.	
Transfert	Transférer 200µl de surnageant dans le support approprié au protocole pour le QIAamp® DNA Mini Kit, NucleoSpin® Tissue et NucleoSpin® 96 Tissue. Transférer 100µl de surnageant dans le support approprié pour le kit ADIAMAG sur automate.	

* ou transférer la solution dans microtube Matrix B et broyer 3 x 45 secondes à 4 m/sec avec le Fast Prep.

2. Avec le kit QIAamp® DNA Mini Kit

Avant de commencer, préparer une étuve ou un bloc chauffant ou un bain-marie à +70°C ou +56°C ou +95°C

	Fèces	Tissu
Lyse	Transférer 200 µl du surchargeant préparé dans le § IV 1-A ou B dans un microtube contenant 180 µl de tampon AL + 20 µl de protéinase K + 5 µl « EPC-Ext » . Homogénéiser.	Transférer 200 µl de broyat d'organes préparé dans le § IV 5-B dans un microtube. Ajouter 360 µl de tampon ATL et 40 µl de protéinase K . Mélanger et incuber 1 heure à +56 ° C . Ajouter environ 300 mg de billes de verre et broyer 10 minutes à 30 Hz dans le Mixer Mill *. Dans un nouveau microtube contenant 200 µl de tampon AL , ajouter 300 µl de surchargeant . Mélanger.
Incubation	Incuber 10 minutes à +70°C.	Incuber 30 minutes à +95°C.
Transfert sur colonne et fixation à la membrane	Ajouter 210 µl d'éthanol 100% dans chaque microtube. Homogénéiser. Déposer la totalité du mélange dans chaque colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Lavage N°1	Changer le tube collecteur. Ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Lavage N°2	Changer le tube collecteur. Ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Centrifugation à vide	Changer le tube collecteur. Centrifuger à 3 minutes à 10 000 g.	
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon AE . Incuber 1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.	

* ou transférer la solution dans microtube Matrix B et broyer 3 x 45 secondes à 4 m/sec avec le Fast Prep.

3. Avec le kit NucleoSpin® Tissue

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Avant de commencer, préparer une étuve ou un bloc chauffant ou un bain-marie à +70°C.

Echantillons biologiques :	Fèces
Lyse	Transférer 200 µl du surnageant préparé dans le § IV 1-A ou B en microtube contenant 180 µl de tampon B3 + 25 µl de protéinase K + 5 µl « EPC-Ext ». Homogénéiser.
	Incuber 10 minutes à +70°C.
Transfert sur colonne et fixation à la membrane	Ajouter 210 µl d'éthanol 100% dans chaque microtube. Homogénéiser. Déposer la totalité du mélange dans chaque colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Lavage N°1	Changer le tube collecteur. Ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Lavage N°2	Changer le tube collecteur. Ajouter 500 µl de tampon B5 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Centrifugation à vide	Changer le tube collecteur. Centrifuger à 3 minutes à 10 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 100 µl de tampon BE préchauffé à +70°C. Incuber 1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.

4. Avec le kit NucleoSpin® 96 Tissue avec centrifugation

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante. Avant de commencer, préparer un système chauffant à +56°C.

Remarque : La totalité des 96 puits peut être utilisée au maximum en 3 fois. Pour une utilisation partielle, filmer les puits non utilisés.

Echantillons biologiques :	Fèces
Lyse	Transférer de 200 µl du surageant préparé dans le § IV 1-A ou B dans la plaque MN Square-well Block contenant 200 µl de tampon BQ1 + 25 µl de protéinase K + 5 µl « EPC-Ext » selon le plan de plaque établi. Filmer la plaque. Agiter la plaque sur un agitateur de plaque.
Incubation	Incuber 15 minutes à +56°C.
Polarisation des acides nucléiques	Ajouter 210 µl d' éthanol 100% dans chaque puits de la plaque MN Square-well Block. Mélanger par flux et reflux à la pipette 10 fois minimum.
Transfert sur plaque et fixation à la membrane	Placer la plaque « NucleoSpin® Tissue Binding plate » (verte) sur la plaque « MN Square-well Block
	Déposer la totalité du mélange dans chaque puits de la plaque 96 NucleoSpin® Tissue Binding plate conformément au plan de plaque établi. Centrifuger 2 minutes à 5600 g. Remarque : si colmatage, rajouter une centrifugation à 5600 g de 3 minutes
Lavage N°1	Ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 2 minutes à 5600 g.
Lavage N°2	Ajouter 700 µl de tampon B5 . Centrifuger 2 minutes à 5600 g.
Séchage de la plaque	Placer la « NucleoSpin® Tissue Binding Plate » sur une plaque 96 propre. Centrifuger 10 minutes à 5600 g.
Elution en plaque 96	Placer la « NucleoSpin® Tissue Binding Plate » sur la plaque d'élution « Rack of MN tube Strips » puis déposer 100 µl de tampon BE préchauffé à +56°C . Important : Incuber 10 minutes . Centrifuger 2 minutes à 5600 g.
Conservation	Fermer la plaque Rack with MN Tube Strips avec des Caps Strips, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.

5. Avec le kit ADIAMAG

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

6. Avec le kit ADIAPURE™ PURIFICATION

Se référer à la version de notice disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAPURE™ PURIFICATION utilisé.

VI. Amplification

a- Déterminer le nombre de tubes PCR nécessaires. Prévoir également des tubes pour les témoins négatifs et positifs d'extraction s'ils ont été réalisés ainsi des tubes pour le témoin positif d'amplification. Nombre final de tubes : **n**.

b- Préparation de la solution d'amplification « A5 » :

Quand « EPC-Ext » est ajouté lors de l'étape d'extraction :

Répartir **20 µl** de solution d'amplification « A5 » dans chacun des tubes PCR ou puits de plaque PCR. Remplacer immédiatement les réactifs à **<-15°C** et à l'obscurité.

Quand « EPC-Amp » est ajouté lors de l'étape d'amplification :

Placer $(n+2) \times 20 \mu\text{l}$ de solution d'amplification « A5 » dans un microtube. Y ajouter $(n+2) \times 1 \mu\text{l}$ « **EPC-Amp** ». Répartir **20 µl** du mélange dans chacun des tubes PCR ou puits de plaque PCR.

c- **Remplacer immédiatement les réactifs à <-15°C et à l'obscurité.**

d- Pour chaque échantillon, ajouter **5 µl** d'extrait d'ADN (tout type d'échantillon sauf la culture) ou **1 µl** pour la culture aux **20 µl** de mélange réactionnel.

Pour le témoin négatif et positif d'extraction, ajouter **5 µl** d'extrait aux **20 µl** de mélange réactionnel

Pour le CTL+, ajouter **5 µl** du « PARATB CTL+ » (§ II-3) aux **20 µl** de mélange réactionnel

Pour le témoin négatif PCR (NTC=No template control), ne rien ajouter dans les **20 µl** de mélange réactionnel.

Remplacer immédiatement les extraits d'ADN à +2/8°C ou <-15°C.

Éliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Dès que tous les tubes ont été préparés, réaliser l'amplification par PCR temps réel.

La cible PARATB est lue en **FAM** et le contrôle positive interne est lu dans le spectre **VIC** ou **HEX**. Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une **référence passive ROX** pour les appareils ABI. La fluorescence est lue pendant l'étape d'élongation (1 minute à 60°C).

Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism** (type 7700 7500, Step-One) d'**Applied Biosystems** (Cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), le rotor gene de **Qiagen** et le chromo 4 de **Biorad** :

1 fois	50°C pendant 2 minutes
1 fois	95°C pendant 10 minutes
45 fois	(95°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 1 minute)

Le programme ci-dessous concerne les **MX3000P** ou **MX3005P** de **Stratagene** :

1 fois	50°C pendant 2 minutes
1 fois	95°C pendant 10 minutes
45 fois	(95°C pendant 30 secondes , 60°C pendant 1 minute)

Roche diagnostic : LightCycler 2*, LightCycler 480*

** **NOTE** : L'utilisation de thermocycleurs LightCycler nécessite au préalable une manipulation de calibration. Nous fournissons la procédure et les réactifs nécessaires à cette calibration.*

Contactez-nous si vous souhaitez utiliser d'autres appareils.

VII. Lecture et interprétation des résultats

1. Définitions

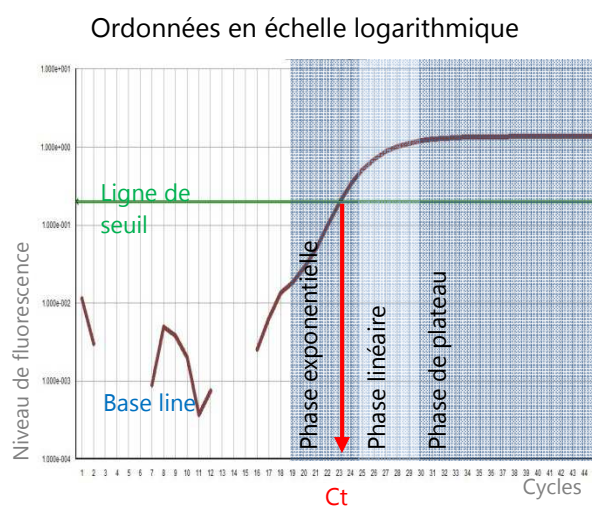
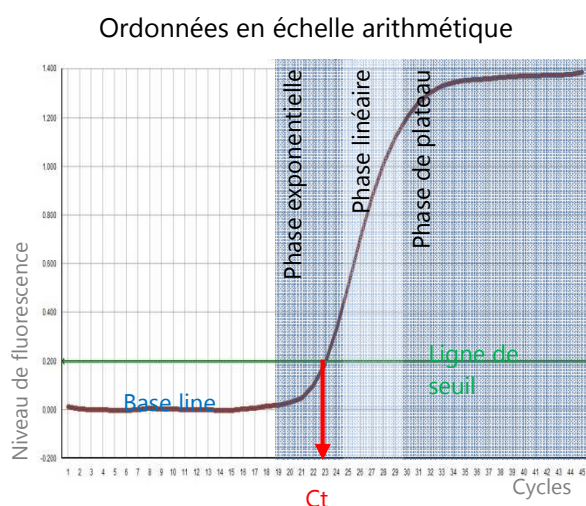
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

Le terme « **courbe d'amplification caractéristique** » qualifie une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, une phase linéaire et une phase de plateau.

La « **ligne de seuil** » ou « **threshold line** » doit être placée au-dessus de la ligne de base, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique ou d'un ensemble de courbes d'amplification caractéristiques.

Le « **cycle seuil** » ou « **threshold cycle** » (**Ct**) d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, à l'abscisse du point d'intersection entre la ligne de seuil et la courbe d'amplification. La valeur de Ct exprimée par l'appareil pour chaque puits dépend ainsi de la position de la ligne seuil et de la charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR.

Exemple d'une courbe d'amplification caractéristique :



2. Validation et interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en VIC ou HEX.

A. Validation de l'essai

CAS N°1 « EPC-Ext »

Le test est considéré comme validé si :

Contrôle	Témoign négative PCR	PARATB CTL+	Témoign négatif d'extraction*	Témoign positif d'extraction *
FAM amplification	Non	Oui	Non	Oui
VIC/HEX amplification	Non	Non/Oui	Oui	Non/Oui
Validation de	Absence de contamination pendant l'amplification	Amplification de la cible	Absence de contamination pendant l'extraction	Des étapes d'extraction et d'amplification

*Optionnel

Les valeurs de Ct indicatifs (FAM et VIC / HEX) du contrôle positif sont indiquées dans le certificat d'analyse du kit.

CAS N°2 : « EPC-Amp »

Le test est considéré comme validé si :

Contrôle	Témoin négatif PCR	PARATB CTL+	Témoin négatif d'extraction*	Témoin positif d'extraction *
FAM amplification	Non	Oui	Non	Oui
VIC/HEX amplification	Oui	Non/Oui	Oui	Non/Oui
Validation de	Absence de contamination pendant l'amplification	Amplification de la cible	Absence de contamination pendant l'extraction	Des étapes d'extraction et d'amplification

*Optionnel

Les valeurs de Ct indicatifs (FAM et VIC / colorants HEX) du PARATB CTL+ sont indiquées dans le certificat d'analyse du kit.

B. Interprétation des résultats

L'échantillon est considéré comme **négatif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC/HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM (exemple A).

L'échantillon est considéré comme **positif** pour *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM. Le contrôle interne peut être co-amplifié en VIC/HEX (exemple B).

Un échantillon est considéré **Non déterminé** si aucune courbe d'amplification caractéristique n'apparaît ni en FAM, ni en VIC/HEX (exemple C). Il est conseillé de refaire le test en double en utilisant l'extrait d'ADN pur et dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau sans nucléases. Si les résultats sont toujours non déterminés, une nouvelle extraction peut être réalisée.

Exemple	A	B	C
Amplification FAM	Non	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Oui/Non	Non
Echantillon considéré	Négatif	Positif	Non déterminé

VIII. Références bibliographiques

Collins J. D. *et al.* (1993) Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 36 : 289-299

Green E. P. *et al.* (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* 17 (22) : 9063-9073

Guillou J. -P. *et al.* (1993) Utilisation de la méthode d'amplification enzymatique in vitro pour la détection de *Mycobacterium paratuberculosis* dans les fèces. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12 (2) : 605-615

Thorel M. -F. *et al.* (1990) Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. *nov.*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. *nov.*, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. *nov.* *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (3) : 254-260

IX. Index des symboles

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Conserver à l'abri de la lumière
	Pour usage vétérinaire in vitro uniquement – Pour usage animal uniquement

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE, ADIAPURE™ et ADIAVET™ sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à ADIAGENE et/ou Bio-X Diagnostics ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.



**S.A.R.L. ADIAGENE**
9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

RCS 417 876 299
Tel. +33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com