



ADIAVET™ LEPTO REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DE *LEPTOSPIRA* PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

Référence :
418026 (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.

ADIAVET™ LEPTO REAL TIME

HISTORIQUE DES REVISIONS.....	3
I. INFORMATIONS GENERALES	4
1. But de l'essai.....	4
2. Leptospirose.....	4
3. Description et principe du test.....	4
II. MATERIEL ET REACTIFS	5
1. Réactifs fournis dans le kit.....	5
2. Validité et conservation.....	5
3. Utilisation du « LEPTO CTL+»	5
4. Matériel nécessaire mais non fourni.....	5
III. PRECONISATIONS AVANT L'ANALYSE DES ECHANTILLONS.....	6
1. Précautions.....	6
2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN	6
3. Préparation des prélèvements.....	6
4. Préparation des témoins.....	6
IV. EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS	8
1. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit.....	8
2. Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue.....	9
3. Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN	10
V. AMPLIFICATION.....	11
VI. INTERPRETATION DES RESULTATS	12
1. Définitions.....	12
2. Validation et interprétation des résultats	12
A. <i>Validation de l'essai</i>	12
B. <i>Interprétation des résultats</i>	13
VII. INDEX DES SYMBOLES.....	14

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 mise en page, ne figurent pas l'historique des révisions

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2014/09	NF154-01	N/A	première publication
2016/07	NF154-02	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF154-02	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF154-02	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §I.3.
2016/11	NF154-03	Modification technique	Ajout prélèvement issu de porc

I. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ LEPTO REAL TIME permet de détecter les leptospires pathogènes par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon, de prélèvements de tissu, de sang total et d'urine de rongeur, de bovin, d'ovin, de caprin, d'équin, de chien et de porc.

2. Leptospirose

La leptospirose est une zoonose de répartition géographique mondiale, observée chez de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme.

D'une manière générale, chez les animaux, les infections chroniques sont beaucoup plus fréquentes que les infections aiguës ou subaiguës et dans la grande majorité des cas les infections sont asymptomatiques. Dans les formes chroniques, le tableau clinique est dominé par des avortements, des néphrites interstitielles et chez certaines espèces par de l'infertilité et des uvéites. Dans les formes subaiguës, les signes généraux sont moins intenses et les avortements fréquents. Les formes aiguës se caractérisent par des septicémies, des hépatites, des néphrites et des hémoglobinuries. Le traitement des formes aiguës doit intervenir de façon précoce pour être efficace.

La mise en évidence de l'agent pathogène dans les prélèvements biologiques (sang en phase de septicémie, tissus et urines pour les formes chroniques) permet une approche diagnostique efficace. Mais l'observation directe est peu discriminante, l'isolement est difficile (germes fragiles et exigeants). Le diagnostic bactériologique des leptospiroses est donc peu opérationnel.

Les leptospires sont divisés en deux espèces d'après des critères sérologiques : *Leptospira biflexa* s.l. regroupant les leptospires saprophytes et *Leptospira interrogans* s.l. constitué des différents sérogroupes de leptospires pathogènes. Cette dernière espèce est actuellement scindée en 7 espèces génomiques.

La classification génétique basée sur les homologues ADN/ADN a divisé les souches de leptospires en 4 espèces non pathogènes, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. parva* et *L. wolbachii* et 7 espèces pathogènes : *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. inadai* et *L. kirschneri*.

Le test PCR ADIAVET™ LEPTO REAL TIME développé ne détecte que les 7 espèces pathogènes.

3. Description et principe du test

Ce test repose sur l'amplification enzymatique de gène ou technique PCR.

Les produits amplifiés sont détectés en temps réel grâce au marquage spécifique de sondes d'hydrolyse (technologie 5'-exonucléase).

Le kit ADIAVET™ LEPTO REAL TIME peut détecter simultanément

- *Leptospira* (sonde marquée en FAM)
- un contrôle interne d'amplification spécifique d'ADN exogène (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX).

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ADN (Qiagen et Macherey-Nagel). D'autres kits de purification peuvent être utilisés s'ils sont validés par l'utilisateur.

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle
Ecouvillon (placentaire, vaginal...)	☒
Tissu (placenta, tissus fœtaux...)	☒
Sang total	☒
Urine	☒

II. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	418026 (100R)
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes verts
LEPTO CTL+	Contrôle positif <i>Leptospira</i>	1 tube violet

2. Validité et conservation

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

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

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 du « LEPTO CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « LEPTO 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 « LEPTO CTL+ » dans un des puits.

4. Matériel nécessaire mais non fourni

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

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermées de qualité optique
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Centrifugeuse pour microtubes, tubes de 15 ml
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Vortex
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free
- Tampon PBS

- Kit d'extraction d'ADN en colonne de silice individuelle

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)

Pour les échantillons de sang: Tampon EL (Qiagen, 1000 ml, réf. 79217)

- NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, 50 tests : réf.740952.50 ou 250 tests : réf. 740952.250)

ou

- Kit d'extraction d'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate

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.

III. Préconisations avant l'analyse des échantillons

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

1. Précautions

Adiagène a validé ce test avec les kits d'extraction d'ADN des sociétés 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 conseillons 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 et d'eau physiologique, 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. Exception faite du sang avec anticoagulant qui ne doit pas être congelé.

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. Préparation des prélèvements

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

4. Préparation des témoins

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'étape d'amplification, quelles que soient les matrices, est validée grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit.

- Le contrôle interne présent dans le réactif A5 vérifie l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « LEPTO CTL+ » valide l'amplification de la cible.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés.

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

Intégrer au moins un témoin négatif dans chaque série d'extraction pour s'assurer de l'absence d'inter-contamination. Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou du tampon de dilution (par exemple du PBS 1X).

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

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant *Leptospira*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *Leptospira*. 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.

IV. Extractions et purifications

1. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante, sauf indication contraire.

Cas particulier des placentas :

Susceptibles de contenir une très grande quantité de microorganismes, ils doivent être manipulés avec précaution.

Possibilité N°1

Inciser chaque cotylédon avec un scalpel et frotter à l'intérieur avec un écouvillon sec.

L'analyse est réalisée en suivant le protocole écouvillon.

Possibilité N°2

Suivre le protocole tissu.

	Ecouvillon	Tissu	Sang	Urine
Préparation de l'échantillon	Vortexer l'écouvillon dans 1 ml de tampon PBS 1X . Transférer 200 µl dans un microtube.	Peser 20 à 30 mg de tissu dans un microtube	Placer 1 ml de sang dans un tube. Ajouter 5 ml de tampon EL . Vortexer, puis incubé 15 minutes sur glace en fusion (~0°C). Centrifuger 30 minutes à 10 000 g à 4°C. Éliminer le surnageant.	Placer 10 ml d' urine dans un tube. Centrifuger 30 minutes à 10 000 g. Éliminer le surnageant.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K . Vortexer. Incuber 30 minutes à +70°C (ou 1 nuit à +56°C).			
	Ajouter 200 µl de tampon AL . Vortexer. Incuber 10 minutes à +70°C .			
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou au vortex (~15 secondes).			
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>			
1^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.			
2^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.			
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 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 .			

2. Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Cas particulier des placentas :

Susceptibles de contenir une très grande quantité de microorganismes, ils doivent être manipulés avec précaution.

Possibilité N°1

Inciser chaque cotylédon avec un scalpel et frotter à l'intérieur avec un écouvillon sec.

L'analyse est réalisée en suivant le protocole écouvillon.

Possibilité N°2

Suivre le protocole tissu.

	Ecouvillon	Tissu	Urine
Préparation de l'échantillon	Vortexer l'écouvillon dans 1 ml de tampon PBS 1X . Transférer 200 µl dans un microtube.	Peser 20 à 30 mg de tissu dans un microtube	Placer 10 ml d'urine dans un tube. Centrifuger 30 minutes à 10 000 g. Éliminer le surnageant.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon T1 et 25 µl de protéinase K . Vortexer. Incuber 30 minutes à +70°C (ou 1 nuit à +56°C).		
	Ajouter 200 µl de tampon B3 . Vortexer. Incuber 10 minutes à +70°C .		
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d'éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou au vortex (~15 secondes).		
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>		
1^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
2^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon B5 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.		
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon BE . Incuber ~1 minutes 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 .		

3. Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN

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.

V. Amplification

a - Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, y compris les témoins utilisés (par exemple les témoins positif et négatif d'extraction, le témoin positif d'amplification (« CTL+ ») et le témoin réactif d'amplification (NTC ou No Template Control)).

b - Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Vortexer. Répartir **20 µl** dans chacun des tubes PCR ou des puits de la plaque PCR avec une pipette munie de pointes Nuclease-free.

c- **Remplacer immédiatement le tube « A5 » à <-15°C et à l'obscurité.**

d- Pour chaque échantillon, le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter **5 µl** d'extrait purifié aux **20 µl** de réactif « A5 ».

Pour le CTL+, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

Pour le témoin réactif d'amplification (NTC), ne rien ajouter au réactif « A5 ».

Remplacer immédiatement les extraits d'ADN purifiés à +2/8°C ou <-15°C. Éliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible *Leptospira* est lue en FAM. Le contrôle interne est lu en VIC ou HEX. Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue pendant l'étape d'élongation (1 minute à 60°C).

Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism** (type 7500, Step-one...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour le **Rotorgene** de **Qiagen** et pour le **Chromo 4** de **Biorad** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Le programme ci-dessous concerne les **MX3000P** et **MX3005P** de **Stratagène** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

30 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

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.

VI. Interprétation des résultats

1. Définitions

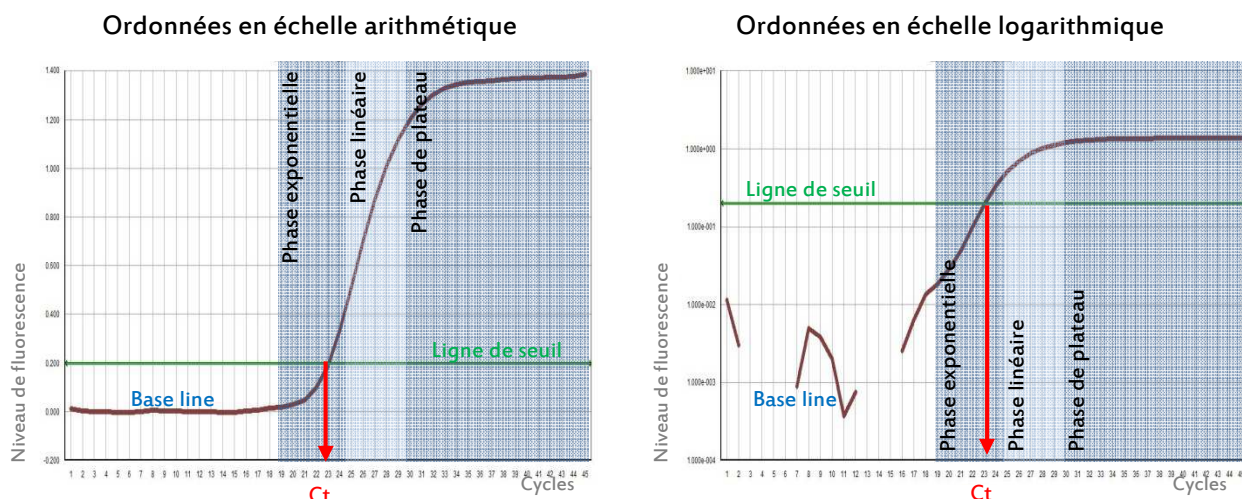
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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/HEX.

A. Validation de l'essai

L'amplification est **valide** si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins :

Témoins	Témoin réactif (NTC)	Témoin positif d'amplification (CTL+)	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	oui
Amplification VIC/HEX	oui	oui	oui	non/oui
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible	Absence de contamination pour l'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

B. Interprétation des résultats

L'extraction de l'ADN et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en *Leptospira* (FAM) ou en contrôle interne (VIC/HEX).

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Non
Résultat	Négatif	Positif	Positif	Non déterminé A refaire

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

L'échantillon est considéré comme **positif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemple B). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié (exemple C).

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple D) indique une déficience de l'extraction de l'ADN (perte ou destruction de l'ADN) ou une PCR temps-réel défectueuse (présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, erreur de programme ou absence d'échantillon). Dans ce cas, il est conseillé de refaire le test en utilisant l'extrait d'ADN pur et dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau Nuclease-free. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction de l'ADN total de l'échantillon est souhaitable.

VII. 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 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.