

# bactotype<sup>®</sup> Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit Manuel

Pour la détection simultanée d'ADN de  
*Mycoplasma gallisepticum* et de *Mycoplasma  
synoviae*



24 réactions (N° de réf. BT288103)



96 réactions (N° de réf. BT288105)



INDICAL BIOSCIENCE GmbH, Deutscher Platz 5b,  
04103 Leipzig, Allemagne

# Sommaire

Contenu du kit.....	3
Utilisation prévue .....	3
Symboles .....	4
Contrôle qualité .....	4
Stockage .....	5
Informations de sécurité .....	5
Introduction.....	6
Principe.....	7
Extraction d'ADN.....	8
Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur.....	9
Remarques importantes .....	10
Précautions générales .....	10
Protocole : PCR en temps réel pour la détection simultanée d'ADN de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> et de <i>Mycoplasma synoviae</i> .....	12
Points importants avant de commencer.....	12
À effectuer avant de commencer .....	12
Procédure .....	13
Analyse et interprétation des données.....	16
Interprétation des résultats.....	16
Historique des modifications .....	20

## Contenu du kit

bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit	(24)	(96)
N° de réf.	BT288103	BT288105
Nombre de réactions	24	96
Master Mix (mélange principal, tube avec bouchon orange) comprend les enzymes, les amorces et les sondes	1 x 500 µl	2 x 980 µl
Positive Control (contrôle positif, tube avec bouchon rouge)	1 x 25 µl	1 x 150 µl
Negative Control (contrôle négatif, tube avec bouchon bleu)	1 x 25 µl	1 x 150 µl
Manuel	1	1

## Utilisation prévue

Le bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit est destiné à la détection simultanée d'ADN de *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) et de *Mycoplasma synoviae* (Ms) sur des frottis trachéaux et oropharyngés de poulets et de dindes et en milieu de culture.

**Réservé exclusivement à un usage vétérinaire.**

# Symboles



Fabricant légal



Numéro de lot



À utiliser avant le



Limites de température pour le stockage



Manuel



Numéro de référence



Référence produit



Conserver à l'abri de la lumière



Pour les échantillons de poulet et de dinde

## Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO d'INDICAL, chaque lot de bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

## Stockage

Les composants du bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit doivent être conservés à une température comprise entre -30 °C et -15 °C et sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter la congélation et décongélation à répétition (plus de deux fois), car cela pourrait réduire la sensibilité des tests. Congeler les composants en aliquotes s'ils ne sont utilisés que de façon intermittente.

## Informations de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles auprès des représentants d'INDICAL ou sur demande par e-mail à l'adresse [compliance@indical.com](mailto:compliance@indical.com).

Tous les résidus d'échantillons et les objets qui ont été en contact avec les échantillons doivent être décontaminés ou éliminés comme des substances présentant un risque potentiel d'infection.

# Introduction

Le bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit est une solution hautement sensible pour la détection d'ADN de *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) et de *Mycoplasma synoviae* (Ms) dans les échantillons de poulet et de dinde. Ce kit PCR multiplexe garantit une détection précoce fiable des deux agents pathogènes dans des échantillons de frottis individuels ou en pools (taille de pool allant jusqu'à 10 échantillons individuels) et en milieu de culture.

Les infections de Mycoplasma se propagent à l'échelle mondiale et entraînent d'énormes pertes économiques dans les élevages de volaille en raison de maladies respiratoires chroniques (Chronic Respiratory Disease, CRD), de taux de croissance réduits et d'une baisse de production d'œufs. Les taux de morbidité et de mortalité peuvent varier considérablement et dépendent des conditions environnementales (par exemple le stress) et des infections secondaires (autres espèces de *mycoplasma*, bactéries ou virus). Le germe *Mycoplasma gallisepticum* peut provoquer des maladies respiratoires chroniques chez le poulet et la sinusite chez les dindes. Une infection de *Mycoplasma synoviae* entraîne une maladie subclinique des voies respiratoires supérieures, voire une synovite, une tendovaginite ou une bursite.

# Principe

La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est décelé au moyen de fluorophores. Ceux-ci sont généralement liés à des sondes oligonucléotidiques qui se lient spécifiquement au produit amplifié. La surveillance des intensités de la fluorescence pendant l'analyse PCR (c.-à-d. en temps réel) permet la détection de l'accumulation de produit sans avoir à rouvrir les tubes de réaction par la suite.

Le bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit contient tous les réactifs nécessaires à la détection de l'ADN de Mg et de Ms, y compris un Positive Control et un Negative Control.

Un contrôle interne exclut la possibilité de résultats faux négatifs.

Le kit utilise trois combinaisons amorce/sonde spécifiques :

- Fluorescence Cy<sup>®</sup>5 pour l'ADN de *Mycoplasma gallisepticum*
- Fluorescence FAM<sup>™</sup> pour l'ADN de *Mycoplasma synoviae*
- Fluorescence HEX<sup>™</sup> pour le contrôle interne (ADN  $\beta$ -actine, présent dans l'échantillon)

Un Positive Control sert à vérifier la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel.

# Extraction d'ADN

Le bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit est destiné à la détection simultanée d'ADN de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Mycoplasma synoviae* sur des frottis trachéaux et oropharyngés de poulets et de dindes et en milieu de culture.

La sensibilité élevée du test permet d'analyser des pools contenant jusqu'à 10 échantillons de frottis individuels.

Avant la PCR en temps réel, l'ADN doit être extrait de la substance de départ. INDICAL propose une gamme de kits validés pour l'extraction de l'ADN à partir d'échantillons animaux.

- QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit
- virotype® Tissue Lysis Reagent

Si la PCR en temps réel n'est pas effectuée immédiatement après l'extraction, conserver l'ADN à une température de -20 °C, ou de -70 °C en cas de stockage plus long.

Pour une préparation rapide des échantillons de frottis sans extraction de l'ADN, INDICAL recommande le réactif de lyse de tissu virotype Tissue Lysis Reagent. Les lysats de frottis doivent être conservés à une température de -20 °C, ou entre 2 et 8 °C pendant une période maximale de 5 jours.

Pour plus d'informations sur l'extraction automatique et manuelle d'ADN de Mg ou Ms de différents types d'échantillons, consulter le manuel correspondant ou contacter l'assistance INDICAL à l'adresse [support@indical.com](mailto:support@indical.com).

# Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur du produit.

- Pipettes
- Pointes de pipette stériles exemptes de nucléase et aérosol-résistantes avec filtres
- Tubes Eppendorf® stériles de 1,5 ml
- Consommables exempts de nucléase (sans RNase/DNase). Des précautions particulières doivent être prises pour éviter qu'une nucléase ne contamine les réactifs et les consommables utilisés pour configurer la PCR en vue de l'identification sensible des acides nucléiques viraux
- Dispositif de refroidissement ou glace
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de 1,5 ml
- Thermocycleur en temps réel avec canaux de détection de la fluorescence appropriés
- Logiciel approprié pour le thermocycleur en temps réel choisi
- Tubes en barrettes avec bouchons, ou microplaque 96 puits à fond optique avec film optique scellant ou couvercle pour le thermocycleur en temps réel choisi

# Remarques importantes

## Précautions générales

L'utilisateur doit toujours faire attention aux éléments suivants :

- Utiliser des pointes de pipette stériles exemptes de nucléase avec filtres.
- Conserver et procéder à l'extraction du matériel positif (prélèvements, contrôles positifs et amplicons) séparément de tous les autres réactifs, puis les ajouter au mélange réactionnel dans un emplacement suffisamment distant.
- Décongeler tous les composants sur de la glace avant de lancer un test.
- Lorsqu'ils sont décongelés, mélanger les composants en retournant les tubes et les passer brièvement à la centrifugeuse.
- Ne pas utiliser les composants du kit de test après la date de péremption.
- Conserver les échantillons et les contrôles sur de la glace ou dans un bloc de refroidissement pendant la préparation des réactions.

## Negative control

Chaque analyse PCR doit comprendre au moins une réaction de Negative Control. Cela permet d'évaluer la contamination dans la réaction.

## Positive control

Lors de l'analyse PCR sur des échantillons inconnus, il est recommandé d'effectuer une réaction de Positive Control dans l'analyse PCR, avec un échantillon connu pour inclure l'ADN ciblé. Un Positive Control sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel. Utiliser 5 µl du Positive Control fourni avec le bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

## Contrôle d'extraction et d'amplification

Pour améliorer la commodité et la sécurité des processus, un test de contrôle d'extraction et d'amplification est inclus sous la forme d'un ensemble amorce/sonde qui détecte un gène domestique présent dans l'échantillon. Cela permet de surveiller aussi bien l'extraction que l'amplification.

# Protocole : PCR en temps réel pour la détection simultanée d'ADN de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Mycoplasma synoviae*

## Points importants avant de commencer

- Lire les « Remarques importantes » à la page 10 avant de commencer.
- Inclure au moins un contrôle positif (Positive Control) et un contrôle négatif (Negative Control) dans chaque analyse PCR.
- Avant de commencer la procédure, lire complètement le protocole et s'assurer de bien comprendre le fonctionnement du thermocycleur PCR en temps réel choisi.
- Exécuter le protocole sans interruption.

## À effectuer avant de commencer

- Décongeler tous les réactifs sur de la glace et les conserver à l'abri de la lumière.
- Conserver les réactifs sur de la glace pendant la préparation de l'analyse PCR.
- Centrifuger brièvement les réactifs avant de les utiliser.

## Procédure

1. Pipetter 20  $\mu\text{l}$  de Master Mix dans chaque tube de réaction. Puis ajouter 5  $\mu\text{l}$  de l'échantillon d'ADN (Tableau 1).

Ajouter la réaction de Positive Control et la réaction de Negative Control.

Positive Control : utiliser 5  $\mu\text{l}$  de contrôle positif (Positive Control) à la place de l'ADN échantillon.

Negative Control : utiliser 5  $\mu\text{l}$  de contrôle négatif (Negative Control) à la place de l'ADN échantillon.

Tableau 1. Préparation du mélange réactionnel

Composant	Volume
Master Mix	20 $\mu\text{l}$
Échantillon	5 $\mu\text{l}$
<b>Volume total</b>	<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

2. Fermer les tubes de réaction avec les bouchons correspondants.
3. Configurer les filtres des marqueurs de fluorescence dans le logiciel du thermocycleur conformément au tableau 2.

Tableau 2. Configuration des filtres pour le marqueur

Pathogène/Contrôle interne	Marqueur
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Cy5
<i>Mycoplasma synoviae</i>	FAM
Contrôle interne	HEX/ JOE™ <sup>1</sup>
Référence passive <sup>2</sup>	ROX™

1 Utiliser l'option correspondant à votre thermocycleur.

2 Référence interne destinée à être utilisée sur les systèmes de détection de séquences ABI PRISM® (Applied Biosystems®)

- Exécuter le protocole de PCR en temps réel conformément au Tableau 3 s'il convient d'exécuter uniquement le bactotype *Mycoplasma Mg/Ms* PCR Kit.

Tableau 3. Protocole de PCR en temps réel pour le bactotype *Mycoplasma Mg/Ms* PCR Kit

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
<b>Activation initiale</b>	95 °C	5 min	1
<b>Cycle en 3 étapes</b>			
Dénaturation	95 °C	15 s	40
Hybridation*	60 °C	30 s	
Extension	68 °C	30 s	

\* Collecte des données de fluorescence.

5. Exécuter le protocole de RT-PCR en temps réel conformément au Tableau 4 si les kits bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit et virotype Influenza A RT-PCR Kit sont utilisés simultanément

Tableau 4. Protocole de RT-PCR du virotype Influenza A pour les tests simultanés

Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
Transcription inverse	45 °C	10 min	1
Activation initiale	95 °C	10 min	1
<b>Cycle en 2 étapes</b>			
Dénaturation	95 °C	15 s	40
Renaturation/extension*	60 °C	60 s	

\* Collecte des données de fluorescence.

# Analyse et interprétation des données

## Interprétation des résultats

Pour que le test soit valide, le Positive Control doit produire un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX avec un  $C_T^1 < 35$ . Le Negative Control ne doit pas produire de signal de fluorescence.

Les résultats suivants sont possibles si l'on travaille avec des échantillons inconnus. Les résultats possibles de l'échantillon sont également résumés dans le Tableau 5 à la page 19.

**L'échantillon est positif pour le Mg, et le test est valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon produit un signal sur les canaux Cy5 et HEX.
- Le Positive Control produit un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX.
- Le Negative Control ne produit de signal, quel que soit le canal.

Il faut noter que de très fortes concentrations d'ADN de Mg dans l'échantillon peuvent donner lieu à un signal HEX atténué ou absent en raison de la concurrence avec le contrôle interne.

---

<sup>1</sup> Cycle seuil ( $C_T$ ) : cycle auquel le graphique d'amplification atteint le seuil, c.-à-d. qu'il y a la première augmentation nettement décelable de la fluorescence

**L'échantillon est positif pour le Ms, et le test est valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon produit un signal sur les canaux FAM et HEX.
- Le Positive Control produit un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX.
- Le Negative Control ne produit de signal, quel que soit le canal.

Il faut noter que de très fortes concentrations d'ADN de Ms dans l'échantillon peuvent donner lieu à un signal HEX atténué ou absent en raison de la concurrence avec le contrôle interne.

**L'échantillon est positif pour le Mg et le Ms, et le test est valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon produit un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX.
- Le Positive Control produit un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX.
- Le Negative Control ne produit de signal, quel que soit le canal.

Il faut noter que de très fortes concentrations d'ADN de *Mycoplasma* dans l'échantillon peuvent donner lieu à un signal HEX atténué ou absent en raison de la concurrence avec le contrôle interne.

**L'échantillon est négatif pour le Mg et le Ms, et le test est valide, si les critères suivants sont remplis :**

- L'échantillon produit un signal seulement sur le canal HEX.
- Le Positive Control produit un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX.
- Le Negative Control ne produit de signal, quel que soit le canal.

Un signal HEX positif signifie que l'extraction et l'amplification ont réussi puisque le gène domestique présent dans l'échantillon est amplifié.

### Analyse de frottis

**Les résultats de l'échantillon sont non concluants et le test est non valide dans le cas suivant :**

- L'échantillon ne produit aucun signal sur aucun des canaux.

La PCR a été inhibée ou l'extraction de l'échantillon était incorrecte. Il est recommandé de retester les échantillons individuels respectifs dans de l'eau exempte de nucléase (p. ex., diluée à 1:5), de répéter l'extraction d'ADN ou de répéter l'ensemble de la procédure de test en commençant avec de nouvelles substances d'échantillon.

### Analyse de substances en culture

**L'échantillon ne contient pas d'ADN de Mg ni de Ms dans le cas suivant :**

- L'échantillon ne produit aucun signal sur aucun des canaux.

Cependant, en raison du manque d'ADN de l'actine  $\beta$  spécifique à la volaille dans les substances en culture, aucune information n'est donnée sur l'inhibition de la PCR ou sur une extraction incorrecte.

Vérifier s'il y a un signal de fluorescence sur tous les canaux pour la réaction du contrôle positif (Positive Control). L'absence de signal pour le Positive Control indique une erreur, qui peut être attribuable à un échec d'extraction d'ADN, à une préparation incorrecte du Master Mix ou à des conditions d'analyse erronées.

Répéter l'extraction d'ADN ou répéter l'ensemble de la procédure en commençant par de nouvelles substances d'échantillon.

Tableau 5. Tableau d'interprétation des résultats\*

Cy5	FAM	HEX	Résultat d'échantillon
(Agent pathogène)			Positif pour :
X		(X)	<i>M. gallisepticum</i>
	X	(X)	<i>M. synoviae</i>
X	X	X	<i>M. gallisepticum</i> <u>et</u> <i>M. synoviae</i>
		X	négatif
			Non concluant

\* L'interprétation des résultats des échantillons peut être déterminée à condition que des réactions de contrôle positif et négatif soient effectuées. Le Positive Control doit produire un signal sur les canaux Cy5, FAM et HEX. Le Negative Control ne doit produire aucun signal, quel que soit le canal. Pour une explication complète des résultats possibles, voir « Analyse et interprétation des données », page 16.

INDICAL propose une gamme de kits ELISA et de kits PCR et RT-PCR en temps réel pour la détection des agents pathogènes chez les animaux.

Consulter le site [www.indical.com](http://www.indical.com) pour plus d'informations sur les produits bactotype, cador, cattletype, flocktype, pigtype et virotype.

Pour obtenir des informations actualisées sur la licence et les clauses de non-responsabilité spécifiques aux produits, consulter le manuel du kit ou le manuel d'utilisation INDICAL correspondant.

## Accord de licence limitée pour le bactotype Mycoplasma Mg/Ms PCR Kit

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. INDICAL n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site [www.indical.com](http://www.indical.com). Parmi ces protocoles supplémentaires, certains ont été fournis par des utilisateurs INDICAL pour des utilisateurs INDICAL. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par INDICAL. INDICAL ne saurait être tenue pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
2. En dehors des licences énoncées expressément, INDICAL n'offre aucune garantie que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne portent pas atteinte aux droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. INDICAL rejette notamment toutes autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. INDICAL est susceptible de faire appliquer les interdictions de ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour les conditions de licence mises à jour, consulter [www.indical.com](http://www.indical.com).

**Marques commerciales :** bactotype®, cador®, cattletype®, flocktype®, pigtype®, virotype® (INDICAL BIOSCIENCE GmbH); QIAamp® (QIAGEN GmbH); ABI PRISM® (Applied Biosystems); FAM™, HEX™, JOE™, ROX™ (Life Technologies Corporation); Cy® (GE Healthcare); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH). Les sondes sous licence fabriquées par Integrated DNA Technologies Inc., les noms déposés, les marques commerciales, etc. cités dans ce document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi.

HB-1601-FR-004 © 2018 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, tous droits réservés.

## Historique des modifications

Manuel	Version	Modification
HB-1601-FR-004	Août 2018	Style INDICAL