

# cador<sup>®</sup> T. equigenitalis PCR Kit Manuel

Pour la détection d'ADN de *Taylorella equigenitalis*

Sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur l'hygiène vétérinaire : FLI-B 470



24 réactions (réf. CD285023)



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

# Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Contenu du kit.....   | 3  |
| Utilisation prévue .....  | 3  |
| Symboles .....  | 4  |
| Contrôle qualité.....   | 5  |
| Stockage .....  | 5  |
| Informations de sécurité .....  | 5  |
| Introduction .....  | 6  |
| Principe.....   | 6  |
| Extraction d'ADN .....  | 7  |
| Équipement et réactifs devant être fournis par l'utilisateur.....                                 | 9  |
| Remarques importantes .....   | 10 |
| Précautions générales.....  | 10 |
| Protocole : PCR en temps réel pour la détection d'ADN de<br><i>Taylorella equigenitalis</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.....   | 19 |

# Contenu du kit

|   |                     |
|---|---------------------|
| <b>cador T. equigenitalis PCR Kit</b>   | <b>(24)</b>         |
| <b>Réf.</b>   | <b>CD285023</b>     |
| <b>Nombre de réactions</b>  | <b>24</b>           |
| cador T. equi Master Mix (mélange principal cador T. equi) (tube avec bouchon bleu) comprend les enzymes, les amorces et les sondes | 2 x<br>12 réactions |
| cador T. equi Positive Control (contrôle positif cador T. equi) (tube avec bouchon rouge)   | 1 x 200 µl          |
| cador T. equi Internal Control (contrôle interne cador T. equi) (tube avec bouchon vert)  | 1 x 1000 µl         |
| cador T. equi Mg-Sol (solution Mg cador T. equi) (tube avec bouchon jaune)  | 1 x 1000 µl         |
| H <sub>2</sub> O (eau pour PCR – tube avec bouchon blanc)   | 1 x 1000 µl         |
| Manuel  | 1                   |

## Utilisation prévue

Le cador T. equigenitalis PCR Kit est destiné à la détection d'ADN de *Taylorella equigenitalis* dans les échantillons prélevés sur les chevaux (écouvillons génitaux, milieu de culture).

Ce kit est approuvé par le Friedrich-Loeffler-Institut et octroyé sous licence conformément à l'article 11 (2) de la loi allemande sur l'hygiène vétérinaire (FLI-B 470) pour une utilisation en Allemagne à des fins de procédures diagnostiques en médecine vétérinaire.

**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 échantillons équins

# Contrôle qualité

Conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO d'INDICAL, chaque lot de cador T. equigenitalis PCR Kit est testé selon des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

# Stockage

Les composants du cador T. equigenitalis 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 cador *T. equigenitalis* PCR Kit est un système prêt à l'emploi de détection d'ADN de *Taylorella equigenitalis* (*T. equigenitalis*).

Le germe *Taylorella equigenitalis* est la bactérie responsable de la métrite contagieuse équine (MCÉ). Il s'agit d'une maladie vénérienne très contagieuse qui affecte les équidés, dont les symptômes chez les juments s'étendent d'une infertilité momentanée à une inflammation purulente grave de la paroi utérine. Les étalons infectés ne présentent aucun symptôme clinique.

La bactérie se propage le plus souvent par transmission directe au cours de l'accouplement. Le dépistage de la bactérie *T. equigenitalis* est essentiel afin d'identifier les animaux infectés avant la période de reproduction. Les animaux infectés peuvent alors être soignés par traitement antibiotique et au moyen d'un désinfectant topique afin d'éliminer la bactérie avant la reproduction.

## Principe

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est identifié 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 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 cador *T. equigenitalis* PCR Kit contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ADN de *Taylorella equigenitalis*, y compris un contrôle positif et un contrôle négatif.

Le T. equi Master Mix contient des réactifs et des enzymes pour l'amplification spécifique d'une région hautement conservée du génome *T. equigenitalis*. Par ailleurs, le kit PCR inclut un système d'amplification hétérologue destiné à l'identification de toute inhibition possible de la PCR. La limite de détection de la PCR analytique du *T. equigenitalis* n'est pas réduite.

Le kit utilise deux combinaisons amorce/sonde spécifiques :

- La fluorescence FAM™ pour l'ADN de *Taylorella equigenitalis*
- La fluorescence HEX™/ JOE™ pour le contrôle interne (T. equi Internal Control)

## Extraction d'ADN

Le cador T. equigenitalis PCR Kit est destiné à la détection d'ADN de *Taylorella equigenitalis* dans les échantillons prélevés sur les chevaux (écouvillons génitaux, milieu de culture).

Avant la PCR en temps réel, l'ADN bactérien 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.

**Remarque** : le cador T. equigenitalis PCR Kit n'est pas compatible avec les méthodes d'isolement de l'ADN bactérien à base de phénol.

Extraction basée sur des billes magnétiques :

- **IndiMag Pathogen Kit** (SP947457 ; anciennement MagAttract 96 cador® Pathogen Kit)
- **IndiMag Pathogen Kit w/o plastics** (SP947257 ; anciennement MagAttract 96 cador Pathogen Kit w/o Plastics)

Extraction basée sur des colonnes de centrifugation :

- **IndiSpin Pathogen Kit** (SP54104, SP54106 ; anciennement QIAamp® cador Pathogen Mini Kit)
- **IndiSpin QIAcube® HT Pathogen Kit** (SP54161 ; anciennement cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit)

De plus, le QIAamp DNA Mini Kit peut être acheté directement auprès de QIAGEN (réf. 51304 ou 51306).

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 plus d'informations sur l'extraction automatique et manuelle d'ADN de *T. equigenitalis* de différents types d'échantillons, consulter le manuel correspondant ou contacter l'assistance INDICAL à l'adresse **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.

- Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline, PBS ; 0,1 M)
- Pipettes
- Pointes de pipette stériles exemptes de nucléase et aérosol-résistantes avec filtres
- 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.
- Tubes Eppendorf® stériles de 1,5 ml
- Agitateur Vortex
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes de 1,5 ml
- Dispositif de refroidissement ou glace
- 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

Au moins une réaction de contrôle négatif (H<sub>2</sub>O, pour PCR) contenant tous les composants de la réaction à l'exception de la matrice pathogène, doit être incluse dans chaque analyse PCR. 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 contrôle positif dans l'analyse PCR, avec un échantillon connu pour inclure l'ADN bactérien ciblé. Un contrôle positif sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel. Utiliser 5 µl du contrôle positif fourni avec le cadon T. equigenitalis PCR Kit pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

## Internal Control

Un contrôle interne (T. Equi Internal Control) est fourni. Ceci permet à l'utilisateur de contrôler la procédure d'isolement de l'ADN et de détecter d'éventuels problèmes d'inhibition de la PCR. Pour cette application, ajouter le contrôle interne au lysat d'échantillon (ou au tampon de lyse) selon un ratio de 0,1 µl pour 1 µl de volume d'élution (par ex. 10 µl de T. Equi Internal Control pour l'élution dans un volume de 100 µl).

**Remarque** : le contrôle interne doit être ajouté uniquement au mélange de tampon de lyse et de substance d'échantillon ou directement au tampon de lyse, mais pas directement dans l'échantillon. En cas d'addition au tampon de lyse, noter que le mélange de contrôle interne et de tampon de lyse doit être préparé extemporanément et utilisé immédiatement.

Alternativement, le contrôle interne peut être utilisé simplement pour détecter d'éventuels problèmes d'inhibition de la PCR. Pour cette application, ajouter 1 µl du contrôle interne et 3,25 µl de T. equi Mg-Sol par réaction directement dans 16,75 µl de T. equi Master Mix, comme décrit dans le protocole.

# Protocole : PCR en temps réel pour la détection d'ADN de *Taylorella equigenitalis*

## 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) (H<sub>2</sub>O, pour PCR) 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.
- Effectuer le protocole sans interruption.

## À effectuer avant de commencer

Avant chaque utilisation, tous les réactifs doivent être mis à décongeler complètement à température ambiante (entre 15 °C et 25 °C), mélangés (en pipetant l'ensemble de manière répétée ou en les passant à l'agitateur à pulsations multiples), puis passés brièvement à la centrifugeuse. Tous les réactifs doivent ensuite être placés dans un bloc de refroidissement entre 2 °C et 8 °C ou sur de la glace.

## Procédure

1. En cas d'utilisation du contrôle interne pour surveiller la procédure d'isolement de l'ADN et pour détecter d'éventuels problèmes d'inhibition de la PCR, suivre l'étape 1a. En cas d'utilisation du contrôle interne uniquement pour détecter d'éventuels problèmes d'inhibition de la PCR, suivre l'étape 1b.
- 1a. Le contrôle interne a déjà été ajouté lors de la procédure d'isolement (voir « Internal Control », page 11). Dans ce cas, préparer un Master Mix, dans un bloc de refroidissement entre 2 °C et 8 °C ou sur de la glace, conformément au tableau 1. Passer à l'étape 2.

Le Master Mix contient généralement tous les composants nécessaires à la PCR excepté l'échantillon. Préparer un volume de Master Mix supérieur d'au moins 10 % à ce qui est nécessaire pour le nombre total d'analyses PCR à effectuer.

Tableau 1. Préparation du Master Mix (contrôle interne déjà ajouté à la procédure d'isolement)

| Nombre d'échantillons          | 1            | 24            |
|--------------------------------|--------------|---------------|
| cador T. equi Master Mix       | 16,75 µl     | 402 µl        |
| cador T. equi Mg-Sol           | 3,25 µl      | 78 µl         |
| cador T. equi Internal Control | 0 µl         | 0 µl          |
| <b>Volume total</b>            | <b>20 µl</b> | <b>480 µl</b> |

- 1b. Le contrôle interne doit être ajouté directement au T. equi Master Mix. Dans ce cas, préparer un Master Mix, dans un bloc de refroidissement entre 2 °C et 8 °C ou sur de la glace, conformément au tableau 2. Passer à l'étape 2.

Le Master Mix contient généralement tous les composants nécessaires à la PCR excepté l'échantillon. Préparer un volume de Master Mix supérieur d'au moins 10 % à ce qui est nécessaire pour le nombre total d'analyses PCR à effectuer.

Tableau 2. Préparation du Master Mix (contrôle interne n'ayant pas été ajouté à la procédure d'isolement)

| <b>Nombre d'échantillons</b>   | <b>1</b>      | <b>24</b>      |
|--------------------------------|---------------|----------------|
| cador T. equi Master Mix       | 16,75 µl      | 402 µl         |
| cador T. equi Mg-Sol           | 3,25 µl       | 78 µl          |
| cador T. equi Internal Control | 1 µl          | 24 µl          |
| <b>Volume total</b>            | <b>21 µl*</b> | <b>504 µl*</b> |

\* L'augmentation de volume occasionnée par l'ajout du contrôle interne n'est pas prise en compte lors de la préparation de l'analyse de PCR. La sensibilité du système de détection n'est pas altérée.

**2. Pipetter 20 µl de Master Mix dans chaque tube de réaction. Ajouter ensuite 5 µl de l'éluat de l'isolement d'ADN (tableau 3).**

Ajouter la réaction de contrôle positif et la réaction de contrôle négatif.

Contrôle positif : utiliser 5 µl de contrôle positif (Positive Control) à la place de l'ADN échantillon.

Contrôle négatif : utiliser 5 µl du H<sub>2</sub>O (pour PCR) fourni au lieu de l'ADN échantillon.

Tableau 3. Préparation du mélange réactionnel

| <b>Composant</b>    | <b>Volume</b> |
|---------------------|---------------|
| Master Mix          | 20 µl         |
| Échantillon         | 5 µl          |
| <b>Volume total</b> | <b>25 µl</b>  |

- 3. Fermer les tubes de réaction avec les bouchons respectifs et centrifuger pendant 30 secondes à 1780 x g (4 000 tr/min) pour rassembler le volume de réaction préparé au fond du tube.**
- 4. Configurer les filtres des marqueurs de fluorescence dans le logiciel du thermocycleur conformément au tableau 4.**

Tableau 4. Configuration des filtres pour le marqueur

| Pathogène/Contrôle interne      | Marqueur              |
|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Taylorella equigenitalis</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 pour utilisation sur les instruments ABI (Applied Biosystems®).

## 5. Effectuer le protocole PCR en temps réel conformément au tableau 5.

Tableau 5. Protocole de PCR en temps réel

| Étape                      | Température | Durée | Nombre de cycles |
|----------------------------|-------------|-------|------------------|
| <b>Activation initiale</b> | 95°C        | 5 min | 1                |
| <b>Cycle en 2 étapes</b>   |             |       |                  |
| Dénaturation               | 95°C        | 15 s  | 40               |
| Hybridation/extension*     | 60 °C       | 45 s  |                  |

\* Collecte des données de fluorescence.

# Analyse et interprétation des données

## Interprétation des résultats

Les résultats suivants 1a – 1c sont possibles si l'on travaille avec des échantillons inconnus. Les résultats possibles des échantillons sont aussi résumés dans le tableau 6, page 17.

### **1a. Un signal de fluorescence est identifié dans le canal FAM (canal vert dans le Rotor-Gene Q).**

**Le résultat de l'analyse est positif : l'échantillon contient de l'ADN de *T. equigenitalis*.**

Dans ce cas, l'identification d'un signal de fluorescence dans le canal HEX (canal jaune dans le Rotor- Gene Q ; contrôle interne) n'est pas nécessaire étant donné que de fortes concentrations initiales d'ADN de *T. equigenitalis* (signal de fluorescence de canal FAM/vert positif) risquent d'occasionner la diminution voire l'absence de signal de fluorescence du contrôle interne en raison de la concurrence.

### **1b. Aucun signal de fluorescence n'est identifié dans le canal FAM (canal vert dans le Rotor-Gene Q). Simultanément, un signal de fluorescence du contrôle interne apparaît dans le canal HEX (canal jaune dans le Rotor-Gene Q).**

**Aucune trace d'ADN de *T. equigenitalis* n'est identifiable dans cet échantillon. Il peut donc être considéré comme négatif.**

En cas de résultat négatif de PCR du *T. equigenitalis*, le signal identifié du contrôle interne exclut la possibilité d'inhibition de la PCR.

**1c. Aucun signal de fluorescence n'est identifié dans le canal FAM (canal vert dans le Rotor-Gene Q) ni dans le canal HEX (canal jaune dans le Rotor-Gene Q).**

**Aucun résultat ne peut être établi.**

Si aucun signal n'est détecté sur les canaux FAM/vert (échantillon) et HEX/jaune (contrôle interne), le résultat n'est pas concluant.

L'absence de signal pour le contrôle interne indique une inhibition de la PCR et/ou d'autres défaillances.

Tableau 6. Tableau d'interprétation des résultats

| FAM | HEX | Résultat d'échantillon                                 |
|-----|-----|--|
| X   | X   | positif pour <i>Taylorella equigenitalis</i>           |
| X   |     | fortement positif pour <i>Taylorella equigenitalis</i> |
|     | X   | négatif  |
|     |     | Non concluant  |

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.

## Notes

## Accord de licence limité pour le cador T. equigenitalis 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 recourir 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<sup>®</sup>, cador<sup>®</sup>, cattletype<sup>®</sup>, flocktype<sup>®</sup>, IndiMag<sup>®</sup>, IndiSpin<sup>®</sup>, pigtype<sup>®</sup>, virotype<sup>®</sup> (INDICAL BIOSCIENCE GmbH) ; MagAttract<sup>®</sup>, QIAamp<sup>®</sup>, QIAcube<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN GmbH) ; Applied Biosystems<sup>®</sup> (Applied Biosystems) ; FAM<sup>™</sup>, HEX<sup>™</sup>, JOE<sup>™</sup>, ROX<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation) ; Eppendorf<sup>®</sup> (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-1591-FR-002 © 2019 INDICAL BIOSCIENCE GmbH, tous droits réservés.

## Historique des modifications

| Manuel         | Version      | Modification  |
|----------------|--------------|---------------|
| HB-1591-FR-002 | Octobre 2019 | Style INDICAL |

**INDICAL**  
BIOSCIENCE

Pour commander :  
**[www.indical.com/contact](http://www.indical.com/contact)**  
Assistance technique :  
**[support@indical.com](mailto:support@indical.com)**  
Site Web : **[www.indical.com](http://www.indical.com)**