

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] MTBC

Cat. N° BIOTK088 - 100 réactions

**Détection des bactéries appartenant au complexe
Mycobacterium tuberculosis (MTBC)
par PCR en temps réel (qPCR)
avec contrôle positif interne (IPC) exogène**

RUMINANTS, FAUNE SAUVAGE

Types de prélèvements

- Nœuds lymphatiques, trachéo-bronchiques, rétro pharyngiens, médiastinaux et mésentériques
- Organes annexes présentant une ou des lésions
- Analyses individuelles

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384, ThermoFisher Scientific - LSI MagVet[®] Universal Isolation kit Cat. N°MV384 ou équivalent)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250 ; Qiagen – QIAamp[®] DNA mini kit Cat N° 51304)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® MTBC dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® MTBC et Bio-T Kit® *Mycobacterium bovis* détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® MTBC, détaillant les différentes étapes de préparation de la qPCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit® MTBC.

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® MTBC sont disponibles sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous :

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	Aucun <i>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)</i>	Aucun	Nouvelle adoption nécessaire
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

PRESENTATION

Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries/parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSella recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

Prélèvements

Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

Envoi

Il est impératif d'effectuer l'envoi immédiatement après le prélèvement ou à défaut de le conserver à $\leq -16^{\circ}\text{C}$. L'envoi doit se faire sous couvert du froid positif en 24h.

Conservation après réception

La conservation des échantillons est recommandée à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ pendant 24h maximum puis $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour un an et $\leq -65^{\circ}\text{C}$ au-delà.

Gamme RUMINANTS

Ce kit appartient à la gamme RUMINANTS qui regroupe un ensemble de kits dédiés à la détection de pathogènes qui partagent des protocoles d'extraction et de PCR communs. En effet, en plus du Bio-T kit® MTBC, BioSella propose un kit spécifique à *mycobacterium bovis*. **Le Bio-T kit® *Mycobacterium bovis* n'a pas fait l'objet d'une validation par le Laboratoire National de Référence (LNR) de la Tuberculose (ANSES, Maison Alfort).**

Description du Bio-T kit® MTBC

Le **Bio-T kit® MTBC** (Cat. N° BIOTK088) contient un **Master Mix* prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- **De l'ADN des mycobactéries du complexe de *Mycobacterium tuberculosis*** (MTBC) grâce à un marquage 6-FAM,
- **D'un contrôle positif exogène IPC ADN**, grâce à un marquage Cy5, à ajouter, lors de l'extraction des acides nucléiques afin de valider la qualité de l'extraction des acides nucléiques et l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

* : Le Master Mix contient de l'uracile N-glycosylase (UNG) afin d'éliminer les contaminations potentielles issues des produits PCR.

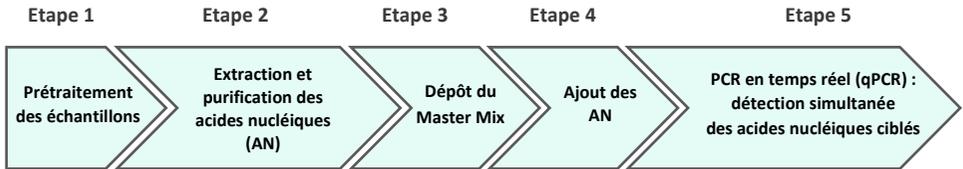
Domaine d'application du Bio-T kit® MTBC

Ce kit, basé sur une détection qualitative des bactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de type nœuds lymphatiques, trachéo-bronchiques, rétro pharyngiens, médiastinaux et mésentériques présentant des lésions visibles ou non et à partir d'organes annexes présentant une ou des lésions, a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR et selon le cahier des charges du Laboratoire National de Référence (LNR) de la Tuberculose (ANSES, Maisons-Alfort)**.

Le Bio-T kit® MTBC a fait l'objet d'une validation initiale par le Laboratoire National de Référence (LNR) de la Tuberculose (ANSES, Maisons-Alfort, France).

Les méthodes d'extraction validées sont décrites dans le manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® MTBC et Bio-T kit® *Mycobacterium bovis*.

Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qPCR



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® MTBC et Bio-T kit® <i>Mycobacterium bovis</i>		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® MTBC		
Organes* (nœuds lymphatiques, trachéo-bronchiques, rétro pharyngiens, médiastinaux et mésentériques)	BioExtract® Column BioExtract® SuperBall® QIAamp® DNA mini kit LSI MagVet™ Universal Isolation kit ou équivalent*	Master Mix prêt à l'emploi MMMTBC-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCMTBC-A)	Détecteurs : FAM/Cy5 Référence passive : ROX Programme : MTBC en ramping Standard ou Fast

* : prétraitement obligatoire

*: En accord avec le LNR de la tuberculose, il est possible d'utiliser un kit d'extraction équivalent au MV384. Se rapprocher du LNR pour plus d'informations.

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit

Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMMTBC-A	2x500 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IPC) exogène Contrôle d'amplification exogène	IPC-B	500 µl	tube bouchon rose Sachet B	≤-16°C Zone « Extraction »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification du MTBC	EPCMTBC-A	200 µl	tube bouchon orange Sachet C	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet C	5°C ± 3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit

Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSellal	ATL19076
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellal	BES384
QIAamp® DNA mini kit	Kit d'extraction ADN format colonne (50)	Qiagen	51304
LSI MagVet™ Universal Isolation kit	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (384)	ThermoFisher Scientific	MV384

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qPCR, l'ADN standard de MTBC (titré en nombre de copies GE/PCR) fourni dans le kit qPCR (tube EPC bouchon **orange**) peut être utilisé.

Pour les adoptions de méthode, une suspension bactérienne de *Mycobacterium bovis* inactivée et titrée, utilisée par BioSellal dans son dossier de validation est requise. Pour plus de précisions, contacter BioSellal (contact@biosellal.com). Un matériel de référence interne (MRI) peut également être fourni.

BioSellal commercialise ces réactifs sous les références suivantes :

Tableau 3. Réactif en option*

Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Suspension bactérienne <i>M.bovis</i>	Suspension bactérienne <i>M.bovis</i> inactivée titrée	BioSellal	SB-MTBC-001
MRI nœuds lymphatiques	Nœuds lymphatiques MTBC positif	BioSellal	MRI-MTBC-001

*Ces réactifs sont disponibles uniquement sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

Principales précautions à appliquer

La tuberculose est une maladie réglementée et les bactéries appartenant au complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) sont à risque zoonotique. Se référer aux réglementations en vigueur pour la manipulation des échantillons pour prévenir la contamination de l'Homme, des animaux et de l'environnement.

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (*a minima* : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la **gamme RUMINANTS** sont à ADN ou à ARN. **Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN** (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), **il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN**:
 - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
 - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
 - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
 - o Utiliser des consommables « RNases free ».
 - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ ou à défaut à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
 - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

DETECTION DE MTBC PAR qPCR AVEC LE KIT BIOTK088

Procédure globale à suivre

1) **Etablir un plan de plaque** définissant la position de chaque échantillon et **incluant les contrôles** décrits ci-dessous :

- **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction voir de prétraitement.
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait d'acides nucléiques au moment du dépôt sur la plaque qPCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.
Ce contrôle est recommandé lors de la 1ère utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
- **Contrôle positif d'amplification du MTBC (EPC)** : il s'agit d'un ADN synthétique (tube **EPCMTBC-A**, bouchon **orange**), contenant la séquence cible spécifique visée par le système de détection du MTBC.
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

⚠ ATTENTION : *La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur la plaque.*

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF d'organes faiblement chargé est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qPCR, la valeur de Ct de ce témoin d'extraction sera, par exemple, reportée et suivie dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qPCR, une valeur de Ct attendue avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. Dans ce cas, l'utilisation de l'EPC livré avec ce kit n'est plus obligatoire. BioSellaal propose un MRI (nœud lymphatique positif pour MTBC) prêt à l'emploi (Cat N°MRI-MTBC-001).

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 10 µl de Master Mix MMMTBC-A** (tube bouchon **blanc**) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau, MRI ou EPC: tube EPCMTBC-A, bouchon orange)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, au contact du Master Mix et en évitant de faire des bulles.

Note : dans le cas où l'IPC exogène n'aurait pas été ajouté lors de l'extraction des échantillons, il est possible de l'ajouter au moment de la préparation de la plaque qPCR.

- **Ajouter 1 µl d'IPC (bouchon rose) en plus des acides nucléiques extraits**

- Ou ajouter directement l'IPC (1 µl par réaction) dans une aliquote de Master Mix avant de déposer 11 µl de ce mélange dans chaque puits d'intérêt et d'y ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits.

Le volume réactionnel sera porté à 16 µl final, sans impacter les performances de la qPCR.

3. Filmer la plaque avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 4, Tableau 5, Tableau 5)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles et de placer les acides nucléiques au contact du Master Mix.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 80 min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et fast. Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

Tableau 4. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard ou Ramping Fast*	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

* : il est important de noter que la différence entre le ramping standard et le ramping fast se fait uniquement sur les temps de montée et descente en température entre les différentes étapes du programme de qPCR. Toutes les étapes du programme de qPCR sont rigoureusement identiques.

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	DéTECTEURS		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
MTBC	FAM	NFQ-MGB ou None*	15 µl = 10 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
IPC exogène	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSellaal (tech@biosellaal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus, MRI et EPC (ADN cible du MTBC).

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME MTBC		
Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle [‡]	2 min [‡]	50 °C [‡]
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	1 min + acquisition des données	60°C

‡ : étape d'activation de l'enzyme Uracil N-glycosylate.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qPCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations selon les paramètres définis dans l'**Annexe C de la norme NF U47-600-1**. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qPCR est validée si les contrôles (EPC, MRI, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles		Interprétation
	MTBC (FAM)	IPC exogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Pos	Validé
	Pos	Pos	Contamination avec un échantillon positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
	Neg	Neg	Oubli d'ajout de l'IPC exogène ? Extraction défectueuse
NC Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau.
EPC Contrôle Positif d'amplification du MTBC OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la qPCR: Erreur de Master Mix? Oubli de l'EPC?
	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
Témoin positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos [†]	Pos [‡]	Validé
	Neg	Neg	Problème lors de la qPCR: Erreur de Master Mix? Oubli d'ajout des acides nucléiques ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque? Dérive du processus : extraction et/ou qPCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?
	Neg	Pos [‡]	Dégradation de l'échantillon contrôle ? Dérive du processus : extraction (si ajout dans la qPCR)

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).

[†] La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle

[‡] La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit[®] MTBC. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
MTBC (FAM)	Cibles		Interprétation
		IPC exogène (Cy5)	
Neg	Pos*		Négatif ou Non détecté
Pos			Positif ou Détecté
Pos		Neg ou Ct>35 [‡]	Positif ou Détecté Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène Présence d'inhibiteurs [†] ? Compétition avec la cible ?
Neg		Neg ou Ct>35 [‡]	Ininterprétable = analyse à refaire Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs [†] ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène ? Problème lors de l'extraction ?

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® MTBC.

[‡] : BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction, de son thermocycleur et d'une matrice donnée. Si la valeur de Ct est inférieure à Ct 35 mais significativement supérieure au Ct maximum toléré, BioSella recommande de considérer l'échantillon comme inhibé et de suivre les recommandations ci-après.

[†] En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qPCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

Notes :



www.biosellal.com

Support Technique

tech@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 62

Renseignements et commandes

contact@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 60

