MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit® *Streptococcus uberis*

Cat. N° BioTK011
25 réactions

Détection et quantification des bactéries *Streptococcus uberis* dans le lait par PCR en temps réel avec contrôle positif interne (IPC) exogène

TOUTES ESPECES

Types d'échantillons

- Lait avec ou sans conservateur/stabilisateur (exemple : bronopol ou glycérol 10% final)
- Conservation à 4°C (avec bronopol) ou congelé (avec glycérol ou sans)

Extractions d'ADN recommandées

- Billes magnétiques (ex: BioSellal - BioExtract ² SuperBall ² Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex: BioSellal - BioExtract ² Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

D'autres kits d'extraction sont utilisables : contacter le support technique pour plus d'informations.

Réservé à l'usage vétérinaire



PRESENTATION

Gamme MILK

Le Bio-T kit ' *Streptococcus uberis* (BioTK011) fait partie de la gamme MILK de BioSellal. Pour tous les kits de la gamme MILK, l'IPC exogène à rajouter lors de l'extraction est le même.

Description du Bio-T kit® *Streptococcus uberis*

La technique de PCR en temps réel (qPCR) permet de révéler la présence d'acides nucléiques (AN) cible de façon précise et rapide. Le Bio-T kit ' *Streptococcus uberis* (BioTK011) permet de détecter dans le même essai, la présence de *Streptococcus uberis* (marquage 6-FAM) et d'un IPC exogène ajouté lors de l'extraction de l'échantillon (marquage Cy5).

Grâce à l'utilisation d'un ADN standard titré (External Positive Control, EPC), reproduisant la séquence ciblée de *S. uberis*, ce système de détection permet en plus d'une utilisation de type qualitative (présence/ absence), de déterminer la charge relative (par rapport à une valeur « témoin » de référence) ou absolue de *S. uberis* présente (exprimée en génome équivalent (GE)) par ml de lait*.

** La concentration de S. uberis exprimée en GE par ml de lait est déduite du nombre de copies détectées par puits et prend en compte le nombre de copie de cible par génome et le rendement du process (prétraitement + extraction) validé par BioSellal.*

Ce kit est utilisable pour l'analyse de laits de quartiers ou de mélange.

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

Etape 1 :

Préparation des échantillons et Lyse des cellules incluant les bactéries. Il s'agit de l'étape de Prétraitement.

Etape 2 :

Extraction/Purification des Acides Nucléiques (AN).

Etape 3 :

Dépôt du Master Mix dans les puits de la plaque ou des barrettes de qPCR et ajout des extraits d'ADN.

Etape 4 :

qPCR en temps réel : amplification et détection simultanée des ADN cibles (ADN *Streptococcus uberis* et ADN IPC) avec quantification relative ou absolue.

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	MMSUB-A	410 µl	1 tube bouchon blanc Sachet A	-20°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Positive Control (IPC)* =contrôle d'amplification exogène	IPC-A	140 µl	1 tube bouchon rose Sachet B	-20°C Zone « Extraction »
External Positive Control (EPC)* = contrôle positif d'amplification de *S. uberis*	EPCSUB-A	110 µl	1 tube bouchon orange Sachet C	-20°C Zone « Ajout d'Acide Nucléique (AN) »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	1 tube bouchon bleu Sachet C	4°C ou -20°C Zone « Ajout d'AN»

* Voir le certificat d'analyse pour les valeurs de référence.

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 pour la partie qPCR

Consommable / Réactif	Description	Fournisseur*	Cat. N°
Tube 1.5 ml†	Microtube safelock PP 1.5 ml	Eppendorf	0030120086
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
Lysing matrix B. tube 2ml	Tube avec billes de silice 0.1mm	BioSellal	116911500

* Liste de fournisseurs donnée à titre indicatif.
† Références données à titre indicatif.

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

Principales précautions à appliquer

- Lors de l'extraction, il est recommandé de travailler sous PSM jusqu'à la fin de l'étape de lyse des échantillons.
- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (blouse, gants jetables, lunettes de protection, ...).
- 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 MM prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des AN 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 -20°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger rapidement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs 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 AN extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.

PRETRAITEMENT DU LAIT

La première phase de cette étape concerne le prétraitement de l'échantillon « lait » et a pour but de lyser les parois des cellules incluant celles des bactéries d'intérêt.

Nous recommandons d'utiliser un volume de **prise d'essai de 800 µl de lait**.

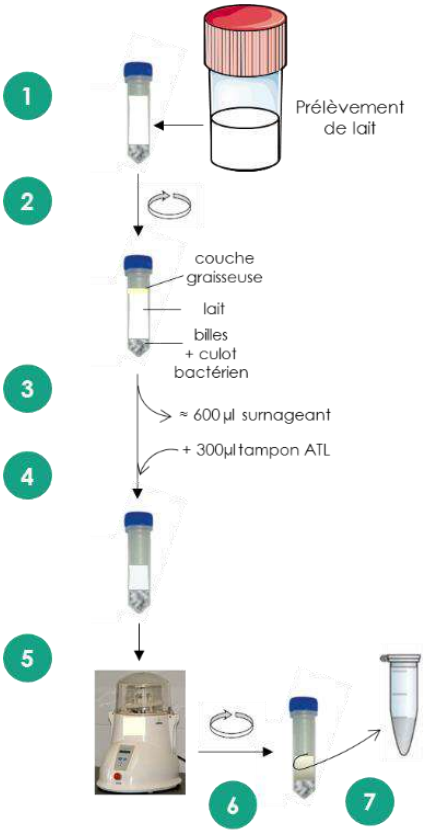
Une étape de broyage est nécessaire (ex : utilisation d'un broyeur FastPrep 24 ™ et de billes adaptées telles que Lysing matrix B de MP Biomedicals).

Le protocole de prétraitement nécessite l'utilisation du tampon « ATL » vendu séparément (BioSellal Cat. N° ATL19076).

Il est obligatoire **d'inclure un échantillon « contrôle négatif » (NCS)** afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons sur l'ensemble du process.

Pour ce contrôle, le lait est remplacé par de l'eau (RNase/DNase free) et sera traité en parallèle des échantillons « lait » d'intérêt depuis l'étape de prétraitement jusqu'à l'étape d'extraction d'ADN incluse.

Figure 1. Schéma présentant le protocole de prétraitement du lait avant extraction



PRETRAITEMENT

1. Transfert de **800µl** de lait dans un tube de 2ml contenant des billes de broyage (ex: silice 0,1mm)
2. Centrifuger 5 min à 10 000 xg
3. Eliminer ≈ 600 µl de surnageant *1
4. Ajouter 300 µl de tampon ATL
5. Broyage : 2x 45s à 6.5 m/s
6. Centrifuger 1 min à 10 000 xg
7. Prélever **200 µl** de surnageant *2 et transférer dans un tube 1.5 ml
   = **prise d'essai pour l'étape d'extraction - purification des ADN génomiques libérés**.

*1 : Eliminer le maximum de la couche graisseuse autant que possible, prélever le surnageant sans assécher le culot/billes, laisser une pellicule de liquide au-dessus du niveau des billes.

*2 : Prélever 200µl de surnageant, éviter de pipeter les bulles ou les reliquats de graisse situés dans la partie haute du surnageant.

EXTRACTION D'ADN

BioSellal propose deux kits d'extraction :

- **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)** basé sur l'utilisation de colonne de silice, préconisé pour l'extraction de 1 à 12-20 échantillons en parallèle.
- **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)** basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation d'automates tels que le KingFisher® Duo, mL ou Flex, préconisé pour l'extraction en parallèle de 12 échantillons ou plus.

Un protocole simplifié pour chaque méthode vous est proposé ci-après. Pour plus d'informations, contacter notre support technique ou se reporter au manuel d'utilisation dédié sur www.biosellal.com.

Note : **L'IPC exogène (tube IPC-A, bouchon rose) fourni dans le Bio-T kit® *Streptococcus uberis*, doit être utilisé à cette étape.**

Extraction sur colonnes

Kit BioExtract® Column
Cat. N° BEC050 ou BEC250

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

Dans un tube de 1.5 ml (non fourni) ajouter :

20 µl de Protéinase K (fournie)

200 µl d'échantillon post prétraitement. Remplacer par 200µl d'eau pour le NCS.

100 µl de solution lyse LA-carrier + IPC préparée comme indiquée dans le Tableau 3 :

Tableau 3. Solution de lyse LA-carrier + IPC

Réactif	Nombre d'échantillons				
	1	6*	12*	24*	30*
Buffer LA (fourni)	100 µl	660 µl	1.32 ml	2.64 ml	3.3 ml
Carrier RNA (1 µg/µl) (fourni)	1 µl	6.6 µl	13.2 µl	26.4 µl	33 µl
IPC exogène (fourni dans le Bio- kit)	5 µl	33 µl	66 µl	132 µl	165 µl

* Afin d'assurer le volume de pipetage le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis.

Vortexer et **incuber 15 min à 20-25°C** (à température ambiante). Centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

Ajouter **350 µl de Buffer LB.**

Vortexer puis centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

2. Adsorption sur la membrane de silice

Transférer délicatement la totalité du lysat (env. 670 µl) **sur la colonne BioExtract® Mini Spin Column** (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml) puis boucher.

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur (Mettre la colonne BioExtract dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter **600 µl de Buffer W1.**

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur.

Ajouter **600 µl de Buffer W2.**

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur.

Centrifuger à **20 000 x g pendant 2 min** pour sécher la membrane.

4. Elution des acides nucléiques

Mettre la **colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube de 1.5 ml** (non fourni) et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter **90 µl de Buffer EL** (à température ambiante ou préchauffé à 70°C) délicatement au centre de la membrane.

Incuber à **température ambiante (15-25°C) pendant 1 min**.

Centrifuger à **20 000 x g pendant 1 min.**

Conserver l'éluat contenu le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

L'ADN extrait peut être **conservé à 4°C si la qPCR est réalisée dans la journée, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C.**

Figure 2. Extraction avec le kit BioExtract' Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)

1 **Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption**		20 µl de Protéinase K 200 µl d'échantillon prétraité 100 µl de solution de lyse LA-carrier +IPC (pour 1 éch.: 100µl Buffer LA + 1µl carrier + 5µl IPC exogène) Température ambiante (TA) 15 min 350 µl de Buffer LB
2 **Adsorption sur la membrane de silice**		Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement 6 000 x g 1 min
3 **Lavages** **Séchage de la membrane de silice**		1er Lavage 600 µl W1 — 6 000 x g, 1 min 2nd Lavage 600 µl W2 — 6 000 x g, 1 min - - — 20 000 x g, 2 min
4 **Elution des acides nucléiques**		90 µl de Buffer EL (TA) TA 1 min 20 000 x g 1 min

Extraction avec billes magnétiques

Kit BioExtract® SuperBall®

Pour utilisation avec KingFisher™ Flex, Duo ou mL

Cat. N° BES384

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Préparation des plaques ou barrettes

Préparer les consommables pour la série d'extraction (voir Tableau 5)

Flex : 4 plaques Deep-wells et 2 microplaques. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter.

Duo : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'élution.

mL: 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

Déposer au fond des puits de la « Deep-well Lysat » (Flex), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL) :

20 µl de protéinase K

200 µl d'échantillon prétraité préalablement vortexé

500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier + IPC, préalablement vortexée vigoureusement (30s).

Le Tableau 4 ci-dessous présente la composition de la solution LAB-SMB-carrier +IPC :

Tableau 4. Solution de lyse LAB-SMB-carrier + IPC

Réactif	Nombre d'échantillons*						
	1	5	10	12	15	48	96
Buffer LA	100 µl	550 µl	1.1 ml	1.32 ml	1.65 ml	5.28 ml	10.56 ml
Buffer LB	400 µl	2.2 ml	4.4 ml	5.28 ml	6.6 ml	21.12 ml	42.24 ml
SMB (SuperBall Magnetic Beads):	25 µl	137.5 µl	275 µl	330 µl	412.5 µl	1.32 ml	2.64 ml
'Carrier RNA' (1 µg/µl)	1 µl	5.5 µl	11 µl	13.2 µl	16.5 µl	52.8 µl	105.6 µl
IPC exogène (fourni dans le B o- kit)	5 µl	27.5 µl	55 µl	66 µl	82.5 µl	264 µl	528 µl

* Afin d'assurer le volume de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis. Le volume de tampon en excès peut être conservé en vue d'une utilisation sous 8 jours au-delà de cette durée il doit être jeté.
: Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes avant la première utilisation ou 1 minute pour les utilisations suivantes.

Distribuer les autres réactifs, en suivant les indications présentées dans le Tableau 5 ci-dessous :
A faire extemporanément ou à fermer pour éviter toute évaporation ou contamination.

Tableau 5. Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, Duo et mL

Position sur la barrette ou la plaque			Elément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex	Duo*	mL		
Deep-well Lysat	Ligne A	Position A	Lysat†	720†
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Buffer W1	700
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Buffer W2	700
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Ethanol (95-100%)	750
Microplaque Elution	Elution strip	Position E	Buffer EL	90
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	Aucun tube mais seulement	Peigne	–

* Les lignes C, D et H sont vides
† Inclus 20 µl de protéinase K, 200 µl d'échantillon prétraité et 500 µl de solution LAB-SMB-carrier+IPC.

2. Lancement du KingFisher™

Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « **BioExtract_KF_Flex**», « **BioExtract_KF_Duo** » ou « **BioExtract_KF_mL** » et démarrer.

En fin de programme, récupérer les éluats (microplaque Elution pour KF 96/Flex, Elution strip pour KF Duo ou puits E pour KF mL).

L'ADN extrait (plaque ou puits fermé ou microtube) peut être **conservé à 4°C si la qPCR est réalisée dans la journée, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C.**

Figure 2. Extraction d'ADN avec le kit BioExtract' SuperBall' (Cat. N° BES384)

	KingFisher™ Flex	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Elément à ajouter
1 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Lysat 	Ligne A 	Position A 	<u>Lysat</u> 20 µl de Protéinase K 200 µl d'échantillon 500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier et IPC
	Deep-well Wash 1 	Ligne E 	Position B 	700 µl de Buffer W1
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	700 µl de Buffer W2
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	750 µl d'éthanol (96-100%)
	microplaque Elution	Elution strip	Position E 	90 µl de Buffer EL
	microplaque Peigne	Ligne B  (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement	Peigne (Rod Cover)
2 KingFisher™	• Allumer le KingFisher™ Flex, Duo ou mL. • Ouvrir la porte du couvercle protecteur. • Sélectionner le programme BioExtract® SuperBall® souhaité à l'aide des touches fléchées. • Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil.			

Pour avoir le programme KingFisher adéquat selon la version de l'automate, veuillez contacter notre support technique (tech@biosellal.com).

DETECTION de *Streptococcus uberis* par qPCR avec le kit Bio-T kit® *Streptococcus uberis*

Procédure globale à suivre

ETAPE 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 remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction.
  Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction et sera positionné en fin de série.

- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : l'eau remplace l'extrait ADN au moment du dépôt sur 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 de détection de *S. uberis* (EPC – tube EPCSUB-A bouchon orange)** : ADN synthétique fourni, titré, avec une valeur de Ct/Cq attendue (se reporter au certificat d'analyse (CA)).
  Ce contrôle est obligatoire.

△ ATTENTION : *La manipulation de ce tube 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 plaque.*

ETAPE 2

Choisir la **méthode de quantification du nombre de bactéries / ml de lait et préparation de l'EPC**

Choix 1 : **Quantification relative**

L'**EPC titré** (tube EPCSUB-A, bouchon orange) doit être dilué pour atteindre une concentration de **10^4 GE /ml** et être utilisé sous forme **d'un point unique (1 cupule)** « témoin » : ce point de dilution correspond au matériel de référence (MR).

La concentration de référence fixée à 10^4 GE /ml de lait est une valeur informative : selon notre expérience, cette valeur correspond à la limite entre une charge bactérienne significative et une charge bactérienne faible.

Le protocole de préparation de l'EPC est décrit dans le Tableau 6 et la Figure3 ci-après.

Une grille de lecture des résultats est présentée en page 19 (voir § *Interprétation des résultats - Lecture des échantillons extraits*).

Choix 2 : **Quantification absolue**

L'EPC titré doit être dilué comme indiqué ci-dessous (voir § *Procédure de dilution de l'EPC* et Figure 3) pour produire **une gamme étalon** de raison 10 **comprenant 5 points** de concentration décroissante de 10^7 à 10^3 GE /ml comme indiqué dans le Tableau 6.

Les 5 puits correspondants aux 5 points de gamme devront être qualifiés comme « standard » lors du paramétrage du logiciel du thermocycleur.

Tableau 6. Relation entre le niveau de dilution de l'EPC et concentration en GE /ml de lait

Facteur de dilution de l'EPC	Non dilué	10^{-1}	10^{-2}	**10^{-3}**	10^{-4}
Concentration GE *S. uberis* / ml lait	10^7	10^6	10^5	**10^4**	10^3
Quantification relative	-	-	-	**x**	-
Quantification absolue	x	x	x	x	x

Procédure de dilution de l'EPC en vue d'une quantification relative ou absolue

△ ATTENTION : *risque de contamination*

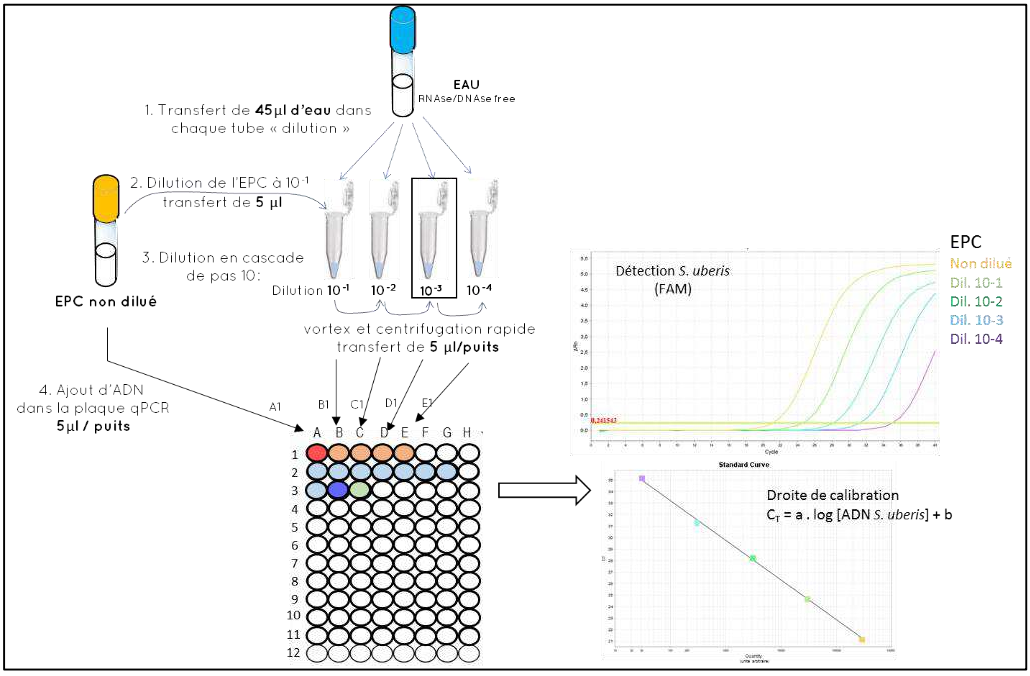
- Il faut réaliser **3** (quantification relative) **ou 4** (quantification absolue) **dilutions en cascade, chacune au 1/10e** (ex : 5 µl dans 45 µl d'eau (tube bouchon **bleu**) ou TE 1X), en utilisant le tube d'EPC non dilué (bouchon **orange**) comme tube de départ.

Les dilutions doivent être préparées de façon extemporanée à partir du tube EPC fourni.

- Prendre soin de **vortexer et centrifuger rapidement chaque tube, entre chaque dilution.**
- **5 µl de la ou des dilutions d'intérêt** en fonction du type de quantification désirée (voir Tableau 6) seront **utilisés pour la qPCR,** selon le plan de plaque défini.

La Figure 3 schématise la procédure de dilutions de l'EPC en vue d'une quantification absolue ou relative.

Figure 3. Schéma de la procédure à suivre pour la préparation de l'EPC en vue d'une quantification relative ou absolue.
Seule la dilution 10^{-1} (encadrée dans la figure) correspondant à une concentration de 10^{4} GE *S. uberis* / ml lait sera utilisée (1 point) pour une quantification relative. Les 5 charges d'EPC produites devront être utilisées (5 points) en quantification absolue pour obtenir une droite de calibration reliant les valeurs de Ct/Cq à la concentration de *S. uberis* (GE/ml) comme montrée dans cette figure.



ETAPE 3

Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et rapide centrifugation, **transférer 15µl de Master Mix MMSUB-A** (bouchon **blanc**) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

Dans la zone dédiée à l'ajout de l'AN

2. **Ajouter 5 µl d'ADN extrait (ou NCS ou eau ou EPC)** / puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, dans le 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 de l'ADN extrait.**

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

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

1. **Paramétrer le thermocycleur** (*voir § Paramètres de réglage du thermocycleur*, Tableaux 7 et 8).
2. 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.
3. **Démarrer le programme** (voir Tableau 8). Durée de run approximative de 65 min.

Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM™ 7500 Fast (Applied BioSystem) en mode Standard et validé sur ABI PRISM™ 7500 Fast (Applied BioSystem) en mode Fast et sur AriaMx™ (Agilent).

	ABI PRISM® 7500 Fast	ABI PRISM® 7500	AriaMx™
Mode	Quantitation - Standard curve	Quantitation - Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Standard par défaut	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX	ROX

Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

Tableau 7. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final/ puits
	Reporter	Quencher	
S. uberis	FAM	NFQ-MGB ou None*	**20 µl** = 15 µl MM + 5 µl ADN extrait ou contrôles†
IPC	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 bioSellal (technique@biosellal.com)
† Les contrôles sont les NC (=eau), NCS (=eau extraite) et EPC (ADN cible *S. uberis*).

Tableau 8. Paramétrage du PROGRAMME CLASSIQUE	
Thermocycleurs	• **ABI PRISM® 7500 Fast** • **ABI PRISM® 7500** • **AriaMx™**

PROGRAMME CLASSIQUE Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	15 s *	95°C
	30 s + acquisition des données	60°C

* Le programme classique avec 15s de dénaturation est compatible avec l'ensemble des Bio-T kit à l'exception de la gamme 48.

NB : la réalisation d'une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR pour l'amplification des génomes à ARN n'a pas d'incidence sur l'efficacité du Bio-T kit® *Streptococcus uberis*.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 9. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles		Interprétation
	S. uberis (FAM)	IPC exogène (CY5)	
NCS = Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Pos*	Validé
	Neg	Neg	▪ Oubli d'ajout d'ADN IPC lors de l'extraction ? ▪ Problème lors de la PCR : Erreur de master mix ? voir l'EPC et le NC
	Pos	Pos*	▪ Contamination avec un échantillon positif lors de l'extraction ou de la préparation de plaque.
NC = Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Validé
	Pos	Neg/Pos	▪ Contamination avec un échantillon positif ou EPC lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix.
EPC = Contrôle Positif de détection de *S. uberis* OBLIGATOIRE	Pos*	Neg	Validé
	Neg	Neg	▪ Problème lors de la PCR : Erreur de master mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos	Pos	▪ Contamination avec un échantillon lors de la préparation de la plaque.

*La valeur de Ct/Cq ne doit être en accord avec la valeur attendue donnée sur le certificat d'analyses (CA)

Lecture des Echantillons extraits

- **Analyse qualitative : lecture des signaux**

Tableau 10. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
Cibles		Interprétation	
S. uberis (FAM)	IPC exogène (CY5)		
Neg	Pos Ct/Cq de référence dans CA	Négatif ou Non détecté	
Pos		Positif ou Détecté	
Pos	Neg ou Ct >35	Positif ou Détecté ▪ Présence d'inhibiteurs ?* ▪ Problème lors de l'ajout de l'IPC ▪ Compétition avec la cible ?	*La quantification relative ou absolue n'est pas possible*
Neg	Neg ou Ct >35	Ininterprétable ▪ Oubli d'addition d'ADN extrait lors de la préparation de la plaque ? ▪ Présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ?*	

* En cas de suspicion d'inhibition, 1) répéter la qPCR en pré-diluant l'ADN extrait au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) reprendre l'analyse depuis l'extraction.

- **Rendu des résultats**

En Quantification Relative

Analyse comparative des valeurs de Ct *S. uberis* obtenues pour les échantillons par rapport à la valeur de Ct *S. uberis* obtenue pour le matériel de référence (MR) au seuil de 10^4 GE/ml.

Tableau 11. Interprétation des résultats qPCR *S. uberis* en quantification relative		
Résultats qPCR		Interprétation
Négatif		Non détecté Quantité de GE < LD_{PCR}
Positif	Ct ≥ Ct MR au seuil 10^4 GE/ml	Positif : +
	Ct < Ct MR au seuil 10^4 GE/ml	Fort Positif : ++

Un document annexe propose des conduites à tenir en termes de surveillance et de traitement des vaches infectées en fonction des résultats obtenus. Ce document est disponible sur notre site www.biosellal.com.

Il est possible de suivre le MR au seuil en carte de contrôle pour s'assurer de la fidélité du process d'amplification.

En Quantification Absolue

Pour estimer la concentration de *S. uberis* dans l'échantillon analysé, exprimée en GE/ml, il faut établir la droite de calibration à l'aide du logiciel du thermocycleur de PCR en temps réel, à savoir :

- Attribuer les valeurs de quantification (GE/ml) pour les 5 points de la gamme EPC définis comme « standards »
- Le logiciel va automatiquement tracer la droite de calibration et indiquer l'équation de droite reliant les valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration de GE/ml.

La valeur d'efficacité E de la PCR va également être calculée : elle doit être comprise entre 85 et 115%.

Note : il est possible que le dernier point de gamme ne sorte pas ou sorte mal, il faut alors l'exclure de la droite en supprimant sa qualification de « standards ».

- Pour chaque valeur de Ct correspondant aux ADN échantillons, le logiciel attribuera une concentration en GE/ml. Cette valeur peut être recalculée à partir de l'équation de droite.

Pour l'interprétation des résultats de façon simplifiée, il est possible de se référer au Tableau 11.

Un document annexe propose des conduites à tenir en termes de surveillance et de traitement des vaches infectées en fonction des résultats obtenus. Ce document est disponible sur notre site www.biosellal.com.

Grille de validation des EPC des Bio-T kits* de la gamme MILK de BioSellal

		Quantification relative		Quantification absolue	
Bio-T kit' Milk valence d'intérêt	Concentration du tube EPC fourni dans le kit (GE/ml)*	Concentration (GE/ml) de l'EPC à sa valeur de référence*	Nombre de dilutions successives au 1/10e à faire pour obtenir l'EPC à la valeur de référence en Quantification relative	Gamme de concentration (GE/ml) de l'EPC	Nombre de dilutions successives au 1/10e à faire pour établir la droite de calibration
Staphylococcus aureus (SAU) - BioTK007	10^{7}	10^{7}	3	10^{7} à 10^{4}	4
Staphylococcus spp (SSP) - BioTK013	10^{7}	10^{7}	3	10^{7} à 10^{4}	4
Streptococcus uberis (SUB) - BioTK011	10^{7}	10^{7}	3	10^{7} à 10^{4}	4
Streptococcus dysgalactiae (SD) - BioTK012	10^{7}	10^{7}	3	10^{7} à 10^{4}	4
Entérobactéries (ETB) - BioTK009	10^{7}	10^{7}	3	10^{7} à 10^{4}	4
Escherichia coli (EC) - BioTK008	10^{11}	10^{11}	4	10^{11} à 10^{7}	4
Klebsiella spp (KSP) - BioTK010	10^{10}	10^{7}	4	10^{10} à 10^{7}	4
Pseudomonas spp (PSP) - BioTK025	10^{7}	10^{7}	3	10^{7} à 10^{4}	4
Trueperella pyogenes (TPY) - BioTK014	10^{10}	10^{7}	4	10^{10} à 10^{7}	4
Mycoplasma bovis (MYB) - BioTK015	10^{10}	10^{7}	4	10^{10} à 10^{7}	4
Streptococcus agalactiae (SAG) - BioTK026	10^{10}	10^{7}	4	10^{10} à 10^{7}	4

* Se reporter au Certificat d'analyse (CA) de chacun des kits pour connaitre les valeurs de Ct attendues.

biosellal

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

