

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] *Babesia* spp & *Theileria* spp

Cat. N° BIOTK036 - 50 réactions

**Détection et quantification relative de *Babesia* et *Theileria*
par PCR en temps réel (qPCR)
avec contrôle positif interne (IPC) endogène**

RUMINANTS

Types de prélèvements

- Sang total (sur tube EDTA)
- Analyses individuelles

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® *Babesia spp* & *Theileria spp* dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction de la gamme BLOOD détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions proposées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® *Babesia spp* & *Theileria spp*, 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® *Babesia spp* & *Theileria spp*.

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation du Bio-T kit® *Babesia spp* & *Theileria spp* est disponible sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

GESTION DES REVISIONS

BioSellal 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 (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)	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, BioSellal 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

Mis à part pour le sang total, 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, idéalement sous couvert du froid positif en 24h.

Conservation après réception

La conservation des échantillons est recommandée à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ pendant 7 jours maximum puis $\leq -16^{\circ}\text{C}$ au-delà.

Gamme BLOOD

La Gamme BLOOD regroupe un ensemble de Bio-T kit® dédiés à la détection dans le sang total d'un ensemble de pathogènes de ruminants qualifiés d'Haemoparasites. Ces agents sont transmis par des insectes ou acariens et sont responsables de syndromes d'hyperthermie marquée avec plus ou moins anémie : *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Babesia-Theileria*, *Mycoplasma wenyonii*, *Anaplasma ovis*, *Mycoplasma ovis*, *Besnoitia besnoitii*.

Un autre agent pathogène (OHV2 responsable du Coryza gangréneux) a été inclus dans la gamme BLOOD puisqu'il peut faire partie du diagnostic différentiel de la Phase fébrile non spécifique de la Besnoitiose caractérisée par une hyperthermie marquée, un épiphora et un jetage séreux filant.

La Gamme BLOOD regroupe un ensemble de kits qui partagent des protocoles d'extraction et de PCR communs.

En plus des Bio-T kit® de la gamme BLOOD, BioSellal propose un kit ELISA permettant la détection des anticorps spécifiques de *Besnoitia besnoiti* (BioLisa®kit *Besnoitia* AB). Pour toute information sur les autres kits de la gamme BLOOD contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

Description du Bio-T kit® *Babesia spp* & *Theileria spp*

Le **Bio-T kit® *Babesia spp* & *Theileria spp*** (Cat. N° BIOTK036) contient un **Master Mix prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- **De toutes les espèces appartenant aux genres *Babesia* et *Theileria*** grâce à un marquage 6-FAM,
- **D'un contrôle positif endogène IPC (*gapdh*)**, grâce à un marquage Cy5, qui permet de confirmer la présence de cellules de l'hôte en quantité suffisante, de valider l'intégrité des acides nucléiques dans l'échantillon et la qualité de l'extraction ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Ce kit, basé sur une détection et une quantification relatifs de ***Babesia* et *Theileria*** (quantification relative par rapport à un EPC) à partir de prélèvements de type sang, a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR** pour la partie PCR.

Les méthodes d'extraction proposées sont décrites dans le manuel d'extraction de la gamme **BLOOD**.

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



Manuel d'extraction de la gamme BLOOD		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® <i>Babesia spp</i> & <i>Theileria spp</i>		
Sang	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MMBabTheil-A	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCBabTheil-A)	Détecteurs : FAM/Cy5 Référence passive : ROX Programmes : Classique ± RT en ramping Fast et Standard

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	MMBabTheil-A	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification de <i>Babesia</i> et <i>Theileria</i> .	EPCBabTheil-A	110µl	tube bouchon orange Sachet B	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet B	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°
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

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 *Babesia* spp & *Theileria* spp (titré en nombre de copies GE/qPCR) fourni dans le kit qPCR (tube bouchon orange) peut être utilisé.

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (à 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 BLOOD** sont à ADN. Toutefois, l'échantillon ou l'extrait d'acides nucléiques peuvent être utilisés pour la recherche d'agents pathogènes avec un génome 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 ET QUANTIFICATION DE *BABESIA* ET *THEILERIA* PAR qPCR AVEC LE KIT BIOTK036

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 voire 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 de *Babesia* et *Theileria* (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCBabTheil-A**, bouchon **orange**), contenant la séquence cible commune à *Babesia* et *Theileria*.
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.
L'EPC est titré en nombre de copies/qPCR et permet la quantification relative de *Babesia* et *Theileria* dans l'échantillon. Il est à utiliser dilué au 1/10 pour atteindre la concentration d'intérêt (exemple : 5 µl d'EPC pur + 45 µl d'eau fournit).

⚠ 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 de sang 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 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 sauf dans le cas d'une quantification relative.

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMBabTheil-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, témoin de processus, MRSI ou EPC: tube EPCBabTheil-A, bouchon orange, pur et au 1/10°)** 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.
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 3, Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6)
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 60min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) . Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lecture de 6-FAM et Cy5.

Tableau 3. 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

Tableau 4. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
<i>Babesia & Theileria</i>	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
IPC endogène	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 et EPC pur ou au 1/10(ADN cible de *Babesia* et *Theileria*).

Tableau 5. Paramétrage du PROGRAMME CLASSIQUE SANS RT†		
Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	15 sec	95°C
	30 sec* + acquisition des données	60°C

* Régler sur 31 sec pour certains thermocycleurs comme l'ABI PRISM® 7500.

† 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 les performances du Bio-T kit® *Babesia spp & Theileria spp.*

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des Bio-T kits® à l'exception des gammes PIG et AVIAN.

Pour les thermocycleurs LightCycler®480 et LightCycler®96 (Roche Life Science), BioSellaal recommande d'utiliser le programme suivant :

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN SANS RT†		
Ramping Standard		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec + acquisition des données	60°C

† Une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR peut être réalisée dans le cadre d'une analyse simultanée avec des pathogènes dont le génome est à ARN

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des kits de la gamme PIG et AVIAN.

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, Témoin positif de processus, 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
	<i>Babesia & Theileria</i> (FAM)	IPC endogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
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 des <i>Babesia</i> et <i>Theileria</i> 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 OBLIGATOIRE <i>SI ACCREDITATION RECOMMANDE 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 ?

* 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 et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® *Babesia spp* & *Theileria spp*. 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.

Rappels :

L'IPC endogène a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants, il ne peut donc être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC. Cependant, un léger signal peut être observé pour l'IPC dans les témoins

en raison d'une réaction croisée entre la GAPDH des ruminants et la GAPDH humaine. Ce signal ne doit pas être inférieur à Ct 35.

Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles		
<i>Babesia & Theileria</i> (FAM)	IPC endogène (Cy5)	Interprétation
Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos		Positif ou Détecté Quantification relative possible
Pos	Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté Pas de quantification relative possible 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'extraction ?

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par BioSella, sont disponibles sur demande. 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.

† 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.

Quantification relative des échantillons positifs

En quantification relative, les valeurs de Ct pour les échantillons sont comparées avec la valeur de Ct obtenue pour le point « Référent ». Ce point correspond à une charge bactérienne (en copies de séquence cible/PCR), identifiée comme étant un seuil facilitant l'interprétation des résultats.

BioSellal recommande un seuil à **1.10³ copies/qPCR**. Si vous utilisez les méthodes d'extraction préconisées par BioSellal, cette quantité peut être extrapolées à **12.10⁵ GE/ml de sang** en estimant un rendement d'extraction de 100% et en considérant une copie de séquences cible par génome (GE) (voir tableau 9).

Le point Référent (REF) est constitué à l'aide de l'EPC du kit (EPCBabTheil-A), à diluer au 1/10⁶ pour atteindre la charge d'intérêt retenue comme seuil.

La charge parasitaire des échantillons est estimée d'après la valeur de Ct obtenue par rapport à la valeur de Ct du point REF comme illustré dans le Tableau9.

Tableau 9. Interprétation des résultats qPCR <i>Babesia</i> & <i>Theileria</i> en quantification relative		
Résultats qPCR		Interprétation
Négatif		Non détecté Quantité de GE/qPCR < LD _{PCR}
Positif	Ct ≥ Ct REF 1.10 ³ GE/qPCR	Positif: +
	Ct < Ct REF 1.10 ³ GE/qPCR	Fort Positif: ++

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

