

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] *Toxin A of Pasteurella multocida*

Cat. N° BIOTK056 – 50 réactions

**Détection du gène de la Toxine A de *Pasteurella multocida*
(PMT ToxA)
par PCR en temps réel (qPCR)
avec contrôle positif interne (IPC) exogène**

SUIDES

Types de prélèvements

- Ecouillons des 2 cavités nasales ou amygdaliens
- Organe : biopsie d'amygdales
- Colonies bactériennes
- Analyse individuelle ou en mélange jusqu'à 5 selon la matrice

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSellal

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

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida* dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction du Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida*, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions proposées par BioSella.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida*, 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® *Toxin A of Pasteurella multocida*.

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida* sont disponibles sur demande, contacter BioSella (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 (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

Il est recommandé d'effectuer l'envoi au plus proche de la date de prélèvement, sous couvert du froid positif.

Conservation après réception

La conservation des échantillons est recommandée à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ pendant 24h (écouvillons) ou 8 jours maximum (organe) et $\leq -16^{\circ}\text{C}$ au-delà pendant 1 an maximum ou à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ au-delà de 1 an. En cas de mise en culture, ne pas congeler les prélèvements.

Gamme PIG

Ce kit appartient à la gamme PIG qui regroupe un ensemble de kits dédiés à la détection de pathogènes porcins tels que PRRSV ou des Coronavirus porcins qui partagent un programme de PCR commun. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal de la gamme AVIAN (informations disponibles sur www.biosellal.com).

Description du Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida*

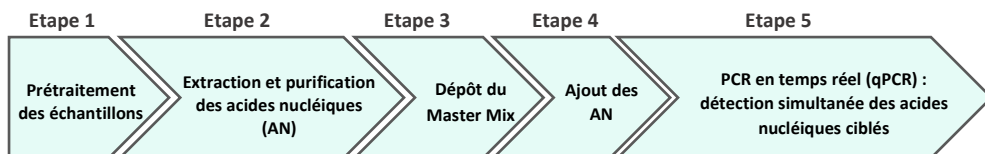
Le Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida* (Cat. N° BIOTK056) permet de **détecter dans le même puits réactionnel, la présence :**

- **Du gène de la toxine A de *Pasteurella multocida* (PMT ToxA)**, impliquée dans la rhinite atrophique, 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.

Ce kit, basé sur une détection qualitative de PMT ToxA (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de type écouvillons des 2 cavités nasales ou amygdaliens ou de colonies bactériennes isolées, 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 décrits dans le manuel d'extraction du Bio-T kit® *Toxin A of Pasteurella multocida*.

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



Manuel d'extraction du Bio-T kit® <i>Toxin A of Pasteurella multocida</i>		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® <i>Toxin A of Pasteurella multocida</i>		
Ecouvillons des 2 cavités nasales ou amygdaliens Biopsie d'amygdales Colonies bactériennes	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Column	MasterMix prêt à l'emploi (MMPMT-A)	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCPMT-A)	Détecteurs : FAM/Cy5 Référence passive : ROX Programmes : PIG/AVIAN ± RT en ramping Standard et Fast

*prétraitement obligatoire

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	MMPMT-A	750 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-A	250 µl	tube bouchon rose Sachet B	≤-16°C Zone « Extraction »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification de PMT ToxA	EPCPMT-A	110 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 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 PMT ToxA (titré en nombre de copies/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 MM 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 PIG** 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 paillasse 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 PMT TOXA PAR qPCR AVEC LE KIT BIOTK056

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 pré-traitement.
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 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 PMT ToxA (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique fourni (tube **EPCPMT-A**, bouchon **orange**), contenant la séquence cible spécifique de PMT ToxA.
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 plaque.

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle »**, **MRI**, un échantillon POSITIF issu d'écouvillon nasal ou amygdalien ou de biopsie d'amygdales, 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 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.

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMPMT-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 ou EPC : tube EPCPMT-A bouchon orange)** par 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 des acides nucléiques (AN) extraits**
- Ou ajouter directement l'IPC (1 µl par réaction) dans un aliquote de Master Mix avant de déposer 16 µl de ce mélange dans chaque puits d'intérêt et d'y ajouter 5 µl d'AN.

Le volume réactionnel sera porté à 21 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 3, Tableau 4, 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.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de **70 min.**

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et confirmé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping Fast et AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut). Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

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	
PMT ToxA	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl MM + 5 µl d'acides nucléiques extraits 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) et EPC (ADN cible de PMT ToxA) et/ou MRI.

Tableau 5. Paramétrage du PROGRAMME PIG SANS RT[†]

Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec	60°C
	+ acquisition des données	

† 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® *Toxin A of Pasteurella multocida* (données présentées dans le dossier de validation).

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, Contrôle 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 6. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles		Interprétation
	PMT ToxA (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 de PMT ToxA 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</i> 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. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par BioSellaal sont disponibles sur demande. BioSellaal 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 7. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles		Interprétation
PMT ToxA (FAM)	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 proposées par BioSellaal sont disponibles sur demande. BioSellaal 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.



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

