

Détection de la bactérie *Vibrio aestuarianus* par PCR en temps réel TaqMan

Laboratoire National de Référence des maladies des mollusques marins

Unité ASIM – IFREMER – La Tremblade

Suivi des modifications

Version	Modifications	Date
V1	Création	Janvier 2025

Sommaire

1. Objet et domaine d'application.....	4
2. Documents de référence.....	4
3. Equipements, réactifs et environnement.....	4
3.1. Equipements et consommables	5
3.2. Réactifs	5
3.2.1. Eau et mastermix	5
3.2.2. Amorces et sondes.....	5
3.3. Environnement.....	6
4. Protocole.....	6
4.1. Préparation des échantillons	6
4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel	6
4.2.1. Témoins pour la PCR	6
4.2.1.1 Témoins positifs.....	6
4.2.1.2 Témoins négatifs	7
4.2.2. Mix de PCR	7
4.2.3. Amplification	8
4.2.4. Résultats	8
4.2.4.1 Traitement des données de fluorescence	8
4.2.4.2 Validation de l'essai	9
4.2.4.3 Interprétation des résultats des échantillons	9
4.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	10
4.4. Gestion des déchets	10
5. Caractéristiques de performance de la méthode	10
Annexe 1 : Interprétation des résultats des témoins	13

1. Objet et domaine d'application

Ce document décrit un protocole standard de diagnostic pour la détection de la bactérie *Vibrio aestuarianus* à partir de tissus de mollusques marins. Ce protocole est basé sur une amplification en temps réel par chimie TaqMan et sur l'utilisation du couple d'amorces DNAj-F/R ciblant le gène DNAj codant pour une protéine de choc thermique.

Il permet la détection de toutes les sous-espèces connues à ce jour de la bactérie *Vibrio aestuarianus*, mais ne permet pas de distinguer les différentes sous-espèces entre elles : *Vibrio aestuarianus francensis*, *Vibrio aestuarianus cardii*, ou *Vibrio aestuarianus aestuarianus*.

2. Documents de référence

- Saulnier D., De Decker S, Haffner P., 2009. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *Journal of Microbiological Methods* 77(2), 191-197.
- Nhung PH, Shah MM, Ohkusu K, Noda M, Hata H, Sun XS, Iihara H, Goto K, Masaki T, Miyasaka J, Ezaki, T., 2007. The dnaJ gene as a novel phylogenetic marker for identification of *Vibrio* species. *Systematic and Applied Microbiology* 30(4), 309-315.
- Tison DL, Seidler RJ, 1983. *Vibrio aestuarianus* - a new species from estuarine waters and shellfish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33(4), 699-702.
- Garcia, C., Mesnil A., Tourbiez D., Moussa M., Dubreuil C., Gonçalves de Sa A., Chollet B., Godfrin Y., Dégremont L., Serpin D., Travers M.A., 2021. *Vibrio aestuarianus* subsp. *cardii*, pathogenic to the edible cockles *Cerastoderma edule* in France, and establishment of *Vibrio aestuarianus* subsp. *aestuarianus* and *Vibrio aestuarianus* subsp. *Francensis*. *Int j syst evol microbiol* 71(2): 004654.

3. Equipements, réactifs et environnement

Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits, matériels et appareils nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Ifremer recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

3.1. Equipements et consommables

- Hotte équipée d'un système UV
- Micropipettes et pointes à filtres pour des volumes compris entre 2µL et 1000µL
- Thermocycleur pour PCR en temps réel
- Plaque de 96 puits pour PCR en temps réel
- Film autocollant ou barrettes et bouchons adaptés au thermocycleur
- Microtubes de 1,5 à 2 mL (exempt de RNase et DNase)
- Centrifugeuse
- Mélangeur de type vortex
- Réfrigérateur
- Congélateur

3.2. Réactifs

3.2.1. Eau et mastermix

- Eau (H₂O) de qualité biologie moléculaire
- Master Mix TaqMan

Les références des mastermix utilisés au laboratoire sont précisées dans le tableau ci-dessous à titre indicatif :

Produit	Fabricant	Référence
SsoAdvanced Universal	Biorad	1725281
Master Mix TaqPath™ qPCR, CG	Applied Biosystems	A16245
Brilliant III Ultra-Fast QPCR	Agilent	600881

Remarque : Lors d'analyses PCR chez les coquillages, il est recommandé de vérifier la présence d'un inhibiteur de PCR dans les échantillons d'ADN.

Au sein du laboratoire, cette recherche se fait à l'aide d'un kit commercial de contrôle interne.

Produit	Fabricant	Référence
Universal exogenous qPCR Positive Control for TaqMan assays	Eurogentec	RT-IPCY-B02 RT-IPCY-B10

3.2.2. Amorces et sondes

Cible	Nom	Séquence (5'→3')	Longueur	Taille amplicon
<i>Vibrio aestuarianus</i>	DNAj-F	GTATGAAATTTTAACTGACCCACAA	25	267 pb
	DNAj-R	TCAATTTCTTTTGAACAACCCAC	22	
	DNAj-probe (HEX)	TGGTAGCGCAGACTTCGGCGAC	22	

3.3. Environnement

Le personnel doit porter une blouse de laboratoire et des gants durant toutes les étapes et doit connaître les pratiques courantes de laboratoire. Le personnel réalisant cette méthode doit également avoir reçu une formation appropriée.

Les différentes étapes PCR sont réalisées dans des pièces séparées selon un principe de marche en avant.

4. Protocole

4.1. Préparation des échantillons

Une fois l'extraction réalisée (cf. protocoles « préparation des échantillons » et « extraction ADN »), les échantillons sont dilués au 1/10 avec de l'eau de qualité biologie moléculaire.

Il est conseillé de vérifier la présence d'inhibiteurs de la réaction de PCR. Si la présence d'inhibiteurs est détectée, les échantillons en présentant pourront être dilués et réanalysés.

Remarque : Il est possible de pas diluer les échantillons mais la présence d'inhibiteurs de la réaction de PCR devra être contrôlée.

4.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel

4.2.1. Témoins pour la PCR

Les témoins négatifs visent à détecter une éventuelle contamination croisée de l'environnement de travail pendant l'extraction de l'ADN et la PCR.

Les contrôles positifs permettent de vérifier que l'extraction d'ADN et la réaction de PCR se sont déroulées correctement.

Les contrôles internes permettent de vérifier la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les échantillons d'ADN et d'éviter la communication de résultats faussement négatifs.

4.2.1.1 Témoins positifs

Un contrôle positif doit être au minimum inclus sur chaque plaque de PCR en temps réel.

Les témoins positifs d'amplification PCR sont réalisés à l'aide de dilutions d'une suspension d'ADN génomique ou plasmidique incluant la région cible DNAjF/R.

La concentration de ces contrôles positifs doit toujours être la même pour pouvoir contrôler les performances de la PCR dans le temps et ne doit pas être trop élevée pour éviter les contaminations (pas plus de 10^6 copies / μL pour les plasmides).

4.2.1.2 Témoins négatifs

Il est conseillé d'inclure au moins deux témoins négatifs PCR par série de PCR.

Ces témoins peuvent être de l'eau ajoutée dans le mélange PCR à la place des échantillons d'ADN (par exemple : eau utilisée pour diluer l'ADN et/ou eau utilisée pour préparer le mélange PCR).

4.2.2. Mix de PCR

- Décongeler les amorces et sondes.
- Calculer le nombre de puits nécessaire pour faire l'analyse et ajouter au moins 2 puits supplémentaires.

Prévoir :

- un puits pour chaque échantillon,
- le nombre de puits nécessaire pour les témoins d'extraction : un témoin positif par série d'extraction, un témoin négatif par centrifugation,
- trois puits pour les témoins PCR :
 - un témoin positif par plaque,
 - au moins deux témoins négatifs par plaque.
- Préparer le mélange réactionnel dans un tube de 1,5 ou 2 mL afin d'obtenir les concentrations finales suivantes :

Réactifs Concentration initiale	Concentration Finale	Volume pour 1 puits (μL)
Mastermix (2X)	1X	10,0
DNAj F (10 μM)	0,3 μM	0,6
DNAj R (10 μM)	0,3 μM	0,6
Sonde DNAj F (HEX) (10 μM)	0,2 μM	0,4
H ₂ O	qsp 15 μL	3,4

- Homogénéiser le mix réactionnel par pipetages (ou vortex).
- Distribuer 15 μL de mélange réactionnel par puits.
- Ajouter 5 μL d'eau dans le(s) puits correspondant(s) au(x) témoin(s) négatif(s) d'amplification.

- Ajouter 5µL d'ADN extrait dans chaque puits selon le plan de plaque.
- Ajouter 5µL de suspension d'ADN plasmidique incluant la région cible (ou d'ADN génomique de *Vibrio aestuarianus*) dans les puits correspondants au(x) contrôle(s) positif(s) d'amplification PCR.
- Fermer les puits.

Le LNR laisse la possibilité aux laboratoires utilisateurs de déposer les échantillons et témoins en simplicat ou duplicat.

Remarque : Les échantillons d'ADN peuvent être testés en parallèle pour détecter la présence d'inhibiteurs de la PCR.

4.2.3. Amplification

Les cycles d'amplification sont réalisés sur un thermocycleur pour PCR temps réel selon le protocole suivant :

<i>Etape préalable uniquement pour le mastermix TaqPath™ qPCR, CG (Applied Biosystems)</i>	2 minutes à 50°C
Dénaturation initiale	3 minutes à 95°C
Nombre de cycles (amplification)	40
Amplification	10 secondes à 95°C
	20 secondes à 60°C
	Mesure de la fluorescence HEX

Remarque : il faut adapter le thermoprofil selon le mix commercial et le thermocycleur utilisés (se conférer à la notice du kit).

4.2.4. Résultats

4.2.4.1 Traitement des données de fluorescence

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel associé au thermocycleur utilisé, selon les recommandations du fournisseur.

Les Ct pour "cycle seuil" sont définis comme le cycle à partir duquel une augmentation statistiquement significative de la fluorescence est détectée (différente du bruit de fond). Le Ct correspond à l'abscisse du point d'intersection entre la courbe d'amplification et la ligne de seuil.

La ligne de seuil (ou « threshold line ») peut être définie par le logiciel du thermocycleur ou définie manuellement. Elle doit être placée au-dessus du bruit de fond, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique (par exemple, en utilisant la courbe du témoin positif d'amplification).

Vérifier toutes les courbes d'amplification afin d'identifier des résultats faux positifs causés par un bruit de fond élevé ou irrégulier. Les résultats issus de toutes réactions impactées de cette façon doivent être considérés comme négatifs.

Vérifier toutes les courbes d'amplification positives avec un profil atypique et ajuster la plage de Ct utilisée pour le calcul de la ligne de base. Si les valeurs Ct ont été impactées, enregistrer les Ct corrigés.

Le bruit de fond est parfois important sur les premiers cycles ; dans ce cas, il est possible de supprimer les premiers Ct de l'analyse afin de faciliter l'interprétation des courbes.

4.2.4.2 Validation de l'essai

Avant de conclure sur le statut des échantillons testés, il est nécessaire de valider les étapes d'extraction et de PCR en analysant les résultats obtenus avec les témoins :

- les témoins négatifs doivent produire un résultat négatif,
- **ET** les témoins positifs doivent présenter une amplification avec le filtre HEX.

Remarque : Une gamme de valeurs Ct attendues peut être définie pour les contrôles positifs. Dans ce cas, les valeurs de Ct obtenus pour les témoins positifs PCR doivent correspondre aux valeurs attendues.

L'essai est considéré valide lorsque tous les témoins présentent des résultats conformes.

Si un ou plusieurs témoins donnent des résultats non conformes, l'analyse peut être répétée à partir de l'extraction de l'ADN ou de la PCR comme signalé dans l'annexe 1.

4.2.4.3 Interprétation des résultats des échantillons

- L'ADN de la bactérie *Vibrio aestuarianus* est considéré comme **déecté** dans un échantillon si une amplification est observée avec le filtre HEX.
- L'ADN de la bactérie *Vibrio aestuarianus* est considéré comme **non déecté** dans un échantillon si aucune amplification n'est observée avec le filtre HEX.

Si des inhibiteurs de la PCR sont déectés dans un échantillon « **non déecté** », cet échantillon doit être considéré comme ininterprétable. Cet échantillon peut être réanalysé à partir de l'étape de la PCR après avoir été dilué (par exemple : dilution 1/100 si l'échantillon a été testé à 1/10).

Remarque : Lors d'analyse d'un échantillon en duplicat, l'ensemble de ces conditions doivent être appliquées à chacun des duplicats. Le résultat d'analyse sera considéré comme douteux lors de différence de résultats entre les duplicats (par exemple, une amplification obtenue pour un seul des duplicats).

4.3. Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les broyats initiaux des échantillons ainsi que les ADN extraits sont conservés à une température inférieure à -16°C pendant au minimum 2 mois au cas où l'analyse devrait être reconduite ou si des analyses confirmatoires sont nécessaires.

4.4. Gestion des déchets

Les déchets doivent être traités selon les conditions autorisées par la réglementation. Le laboratoire doit également mettre en œuvre des mesures pour garantir la non-dissémination des organismes pathogènes dans l'environnement.

5. Caractéristiques de performance de la méthode

Ces critères ont été établis selon les recommandations de la norme NF U 47-600-1 et 2 : Méthodes d'analyse en santé animale PCR.

Critère de performance	Résultats obtenus
Type de méthode	Méthode qualitative
Inclusivité	<p>Elle a été évaluée <i>in silico</i> et <i>in vitro</i>.</p> <p>L'évaluation <i>in silico</i> a été réalisée via BLAST sur GenBank : toutes les souches et sous espèces connues de la bactérie <i>Vibrio aestuarianus</i> semblent être détectés par cette PCR (100% d'identité). En revanche, il n'est pas possible de discriminer les sous-espèces entre elles via cette PCR temps réel.</p> <p>L'évaluation <i>in vitro</i> a été réalisée à partir d'un panel de 11 échantillons infectés (confirmation par séquençage) issus de différents hôtes (<i>Magallana gigas</i>, <i>Cerastoderma edule</i>, <i>Mytilus edulis</i>) et de différentes régions de France (Hauts-de-France, Normandie, Bretagne, Vendée, Hérault). 100% des échantillons ont été détectés.</p>

Exclusivité	<p>Elle a été évaluée <i>in silico</i> et <i>in vitro</i>.</p> <p>L'évaluation <i>in silico</i> a été réalisée via BLAST sur GenBank : aucune autre bactérie ni aucun organisme pathogène pouvant infecter les mollusques marins n'ont été détectés.</p> <p>L'évaluation <i>in vitro</i> a été réalisée à partir d'un panel de 14 souches de bactéries du genre <i>Vibrio</i> (<i>Vibrio splendidus</i>, <i>V. coralliilyticus</i>, <i>V. neptunius</i>, <i>V. harveyi</i>, <i>V. jasicida</i>, <i>V. rotiferianus</i>, <i>V. europaeus</i>, <i>V. atlanticus</i>, <i>V. crassostreae</i>, <i>V. chagasii</i>, <i>V. gigantis</i>, <i>V. tubiashii</i>, <i>V. owensii</i> et <i>V. cortegadensis</i>) et de 4 échantillons infectés par d'autres organismes pathogènes endémiques en France (<i>OshV-1</i>, <i>Marteilia refringens</i>, <i>Haplosporidium nelsoni</i>, <i>H. costale</i>). Aucun échantillon n'a présenté d'amplification avec cette PCR temps réel.</p>
LD _{PCR}	<p>Résultats obtenus lors de 3 séances de PCR, 8 réplicats par niveau de dilution. Dernière dilution détectée dans 95% des cas.</p> <p>La LD_{PCR} a été établie à la quantité de 5 copies d'ADN / μL.</p>
LD _{Méthode}	<p>Résultats obtenus lors de 2 séances d'extraction présentant 4 niveaux de concentrations et 4 réplicats d'extraction par niveau pour chaque séance, en se plaçant en condition de fidélité intermédiaire (changement d'opérateur, changement de thermocycleur).</p> <p>La méthode a permis une détection de 100 % des réplicats pour les concentrations égales ou supérieures à 2,5 fois la LD_{PCR}.</p> <p>La concentration 2,5 LD_{PCR} correspond à 12,5 copies de plasmides / μL testé ; cela équivaut à 625 copies / mg de tissus.</p>
Fidélité intra laboratoire : Répétabilité et Fidélité intermédiaire	<p>Les coefficients de variation (CoV) des Ct intra laboratoire sont inférieurs à 5% pour les concentrations supérieures à la Limite de Détection (LD).</p> <p>Etape PCR : CoV des Ct compris entre 0,69 et 2,6% pour les concentrations \geq LD_{PCR}</p> <p>Méthode complète : CoV des Ct compris entre 2,8 et 3,7% sur les concentrations \geq 2,5 LD_{PCR}.</p>
Sensibilité diagnostique	<p>En cours de réévaluation.</p> <p>Elle avait été estimée à 100% (estimation classique) et à 92,1 % (estimation par des analyses en classes latentes en condition de dépendance) mais les ADN des échantillons analysés étaient systématiquement ajustés à la concentration de 5 ng/μL (Rapport d'activité 2013 du LNR).</p> <p>Elle avait été déterminée à l'aide d'un panel de 286 individus issus soit de populations à prévalence élevée soit de populations à prévalence faible.</p>

Spécificité diagnostique	<p>En cours de réévaluation.</p> <p>Elle avait été estimée à 100% (estimation classique) et à 91,1 % (estimation par des analyses en classes latentes en condition de dépendance) mais les ADN des échantillons analysés étaient systématiquement ajustés à la concentration de 5ng/μL (Rapport d'activité 2013 du LNR).</p> <p>Elle avait été déterminée à l'aide d'un panel de 286 individus issus soit de populations à prévalence élevée soit de populations à prévalence faible.</p>
--------------------------	---

Annexe 1 : Interprétation des résultats des témoins

Témoins négatifs		Interprétation / Action
T- Ext	T- PCR	
-	-	Valide
+	-	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape d' extraction , a minima pour les échantillons ayant des résultats positifs .
-	+	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , a minima pour les échantillons ayant des résultats positifs .
+	+	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , et si cela ne résout pas le problème, répéter l'analyse à partir de l'étape d'extraction .

Témoins positifs		Interprétation / Action
T+ Ext	T+ PCR	
+	+	Valide
-	+	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape d' extraction , a minima pour les échantillons ayant des résultats négatifs .
+	-	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , a minima pour les échantillons ayant des résultats négatifs .
-	-	Non valide. Répéter l'analyse à partir de l'étape PCR , et si cela ne résout pas le problème, répéter l'analyse à partir de l'étape d'extraction .

Résultat obtenu avec les témoins : « - » = non détecté, « + » = détecté.
Les résultats conformes sont en noir, les résultats non conformes sont en rouge.

T- Ext : Témoin négatif d'extraction (absence d'échantillon)

T+ Ext : Témoin positif d'extraction (par exemple, plasmide ajouté dans une matrice de tissus négatifs)

T- PCR : Témoin négatif d'amplification (par exemple, eau)

T+ PCR : Témoin positif d'amplification (par exemple, plasmides)

FIN DU DOCUMENT