Notice d'utilisation
ADI045-PTUB_NO_(FR)_V01
06/2023

PARATB REAL TIME

Référence : ADI045-100

Test pour la détection et quantification de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* par amplification enzymatique de gène en temps réel
Test PCR – 100 réactions

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire

Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Fèces	✓	5
Environnement (raclage de bouses)	✓	✗
Lait	✓	✗
Culture bactérienne	✓	✗
Tissu	✓	✗

* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer).

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI045-100 100 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
PARATB CTL+	Contrôle positif *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	Contrôle exogène non-cible d'extraction	2 x 300 µL tubes à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
EPC-Amp	Contrôle exogène non-cible d'amplification	1 x 100 µL tube à bouchon incolore (Réactif prêt à l'emploi)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Révision documentaire

Date	Version	Modifications
01/2020	NF045-10	Ancienne version
06/2023	ADI045-PTUB_NO_(FR)_V01	Notice simplifiée Ajout de matériel de préparation de fèces ADIAPREP Quantification à l'aide d'un CTL+ Disponibilité des kits complémentaires

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

A. Introduction

La paratuberculose est une maladie contagieuse et fatale qui touche principalement les ruminants domestiques comme les moutons, les vaches et les chèvres. Elle est aussi appelée « maladie de Johne ». La paratuberculose est causée par la bactérie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) qui se multiplie dans les intestins et est excrétée dans les matières fécales. Le niveau de contamination de celle-ci évolue en fonction du stade de la maladie, de quelques bactéries par gramme de fèces en début de phase chronique, jusqu'à 10^4 à 10^{10} en phase clinique (Collins et al., 1993). Cette bactérie peut ensuite être disséminée dans l'organisme de l'animal par l'intermédiaire des macrophages ; la contamination par le colostrum, le lait et le sperme sont alors possibles.

La mise en évidence de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* par culture est longue et fastidieuse (6 à 8 semaines). La détection par PCR est la méthode la plus rapide et spécifique pour mettre en évidence *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
La quantification de MAP dans les fèces est utilisée pour classer les animaux, et identifier les animaux les plus excréteurs.

Le test ADIAVET™ PARATB REAL TIME permet de réaliser au choix :

- Un test PCR qualitatif.
- Un test PCR quantitatif en réalisant une gamme de quantification à partir du PARATB CTL+, en Equivalent Genome / gramme de fèces.
- Un test PCR relatif avec l'utilisation d'un fèces positif quantifié de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, fourni sur demande, (réf. ADC04SQ01).

B. Principe du test

Le test ADIAVET™ PARATB REAL TIME repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Il détecte simultanément en monocupule :

- *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (sonde marquée en FAM).
- Contrôle exogène non-cible (sonde marquée en HEX ou équivalent) qui peut être utilisé :
  - Comme contrôle d'extraction et d'amplification si l'EPC-Ext est ajouté à l'échantillon au cours de l'extraction des acides nucléiques (à utiliser lors de l'extraction d'ADN en billes magnétiques ADIAMAG ou Colonnes de silice).
  - Comme contrôle uniquement d'amplification si l'EPC-Amp est ajouté à la solution d'amplification (à utiliser pour le kit d'extraction ADIAPURE™ PARATB MILK).

C. Conditions de stockage

A réception, le kit doit être stocké à <-15°C jusqu'à sa date de péremption.
Il est recommandé d'aliquoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite d'effectuer plus de trois décongélations.
Ne pas décongeler plus de 3 fois.
Stocker à l'abri de la lumière.
Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel.
- Appareil d'homogénéisation pour tubes.
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL.
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes.
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 mL et 2 mL.
- Gants latex ou nitrile non poudrés.
- Eau Nucléase-free.
- Système de pré-filtration :
  - ADIAPREP™ (Bio-X Diagnostics, réf. ADPREP-200 (200 tests))
  - ADIAFILTER™ (Bio-X Diagnostics, réf. ADIFIL100 (100 tests))
- Billes de broyage :

Pour le vibrobroyeur à billes de type Mixer Mill :

- ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBIA-480 (480 tests)).
- ADIAPURE™ GLASS BEADS RACKS 4x96 (Bio-X Diagnostics, réf. ADPBIAR-4x96 (384 tests)).

Pour le vibrobroyeur à billes de type Fast Prep ou Ribolyser :

- Lysing Matrix B (MP biomedicals, 100 tubes, réf. 116911100).

- Kit d'extraction des acides nucléiques.

Kits complémentaires pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **Extraction Positive Control PARATB (Réf. : ADC04EPC).** Matériel de référence fournisseur pour adoption de méthode (LD et LQ méthode) et pouvant également être utilisé comme sentinelle (Calibré entre 1 et 100x$LD_{Méthode}$).
- **LDpcr Positive Control – PARATB (Réf. : ADC04LD)** Confirmation des performances – LDpcr et LQpcr du kit.
- **Quantified Extraction Positive Control PARATB Faecal (Réf. : ADC04SQ01).** Fèces positive d'extraction quantifiée en PARATB pour identifier les forts positifs (calibré à 10000 EG/gramme de fèces selon la publication de Kralik, P. *et al*, 2014 ; Beinhauerova, M et al, 2021).

E. Précautions d'utilisation et de sécurité

- Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement.
- Pour usage animal uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Lire l'ensemble du protocole avant de commencer et le respecter scrupuleusement.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption du kit.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

F. Préparation des échantillons de fèces ou prélèvements environnementaux

Les acides nucléiques doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit PCR.

1. Avec ADIAPREP (réf. ADPREP-200)

- Prélever 1 cuillère de matière fécale à l'aide du dispositif ADIAPREP.
- Araser la cuillère et la ré-introduire dans le dispositif.
- Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Transférer 1 mL dans un microtube, une barrette ou une plaque 96 puits.
- Centrifuger 5 minutes à 3 000 g et éliminer le surnageant.
- Ajouter au culot 300 mg de billes de broyage et 500 µL d'eau déminéralisée stérile.
- Broyer 5 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 secondes sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 3 000 g.
- Extraire un volume de surnageant à l'aide d'un kit d'extraction recommandé.

2. Avec ADIAFILTER (réf. ADIFIL100)

- Prélever 3 g (+/- 0,2) de matière fécale, vortexer dans 20 mL d'eau déminéralisée stérile (ou ratio identique Poids/volume) jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Laisser sédimenter 10 à 20 minutes.
- Déposer 10 mL de surnageant dans l'ADIAFILTER, centrifuger 5 minutes à 3 000 g et éliminer le surnageant et le filtre ADIAFILTER.
- Ajouter au culot 500 µL d'eau déminéralisée stérile, vortexer et transvaser dans un microtube ou barrette contenant 300 mg de billes de broyage.
- Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 sec sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 15 000 g.
- Extraire un volume de surnageant à l'aide d'un kit d'extraction recommandé.

3. Sans système de pré-filtration de prélèvement

- Prélever 3 g (+/- 0,2) de matière fécale, vortexer dans 20 mL d'eau déminéralisée stérile (ou ratio identique Poids/volume) jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Laisser sédimenter 10 à 20 minutes.
- Transférer 1 mL dans un microtube ou barrette contenant 300 mg de billes de broyage.
- Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 sec sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes 15 000 g.
- Extraire un volume de surnageant à l'aide d'un kit d'extraction recommandé.

G. Mode opératoire

1. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext doit être ajouté dans tous les échantillons et les témoins d'extraction (excepté lors de l'utilisation de ADIAPURE™ PARATB MILK kit).

Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

Pour chaque extraction, ajouter **5 µL** d'EPC-Ext par échantillon dans le premier tampon de lyse du kit d'extraction.

2. Kits d'extractions

Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés et fournis par Bio-X Diagnostics :

Nom du produit	Technologie d'extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG™	Billes magnétiques	200 tests : réf. NADI003 800 tests : réf. NADI003-XL
ADIAPURE™ PARATB MILK	Capture sur billes magnétiques à partir de lait	100 tests : réf. ADIADP04M1-100

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit PCR utilisé pour l'ADIAMAG™ ou du kit d'extraction pour l'ADIAPURE™ PARATB MILK.

D'autres kits d'extraction que ceux validés ou recommandés dans le dossier de validation du kit peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8°C pendant 24 heures avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à – 15°C.

3. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définis par les normes en vigueur (Cf. AFNOR U47-600…).

Contrôles	Validation de	Mode opératoire
Témoin réactif (NTC)	Absence de contamination pour l'amplification	5 µL NF-Water dans un puits par série PCR
PARATB CTL+ (Dilution pure à 1/100 000)	Amplification de la cible et gamme étalonnage	5 µL CTL+ dans un puits pour chaque point de gamme et par série PCR
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X $LD_{Méthode}$) par série d'extraction
Témoin fèces positif quantifié pour PCR relative	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif quantifié) par série d'extraction

4. Utilisation de l'EPC-Amp

L'EPC-Amp est utilisé quand l'EPC-Ext n'a pas été utilisé lors de l'extraction des acides nucléiques (exemple : kit ADIAPURE™ PARATB MILK).

Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

Pour chaque puits PCR, ajouter **1 µL** d'EPC-Amp dans la solution d'amplification. (Se reporter au § « Amplification », Etape 1).

5. Préparation du contrôle CTL+

Ajouter **200 µL** de « NF-Water » par tube.
Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.

Après reconstitution, aliquoter la solution et la stocker à une température inférieure à -15°C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Dans le cas d'un test quantitatif, réaliser, extemporanément, une gamme étalon en eau Nucléase-free (4 points de gamme minimum dont 1 à la LQ_{PCR}).

Dilution	Concentration du PARATB CTL+ (Copies IS900/PCR)
Pure	**10^6**
1/10	**10^5**
1/100	**10^4**
1/1000	**10^3**
1/10000	**10^2**
1/100000	**10 (=LD-LQ PCR)**

Utiliser **5 µL** de chaque dilution dans les puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

Dans le cas d'un test qualitatif ou relatif, utiliser **5 µL** de la dilution **1/1000** dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

6. Amplification

Attention :

- Avant de commencer, décongeler les réactifs à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Homogénéiser tous les réactifs et échantillons avant utilisation.
- Replacer le reste des réactifs à une température inférieure à -15°C, après distribution.

Etape 1 :
Si utilisation de l'EPC-Ext à l'étape d'extraction :
Répartir **20 µL** de réactif d'amplification A5 dans chaque puits PCR.
Si non-utilisation de l'EPC-Ext à l'étape d'extraction :
Placer (n+1) x **20 µL** de réactif d'amplification A5 dans un microtube et y ajouter (n+1) x **1 µL d'EPC-Amp**. Répartir **20 µL** du mélange dans chaque puits PCR.

Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits des échantillons et **5 µL** de contrôles dans chaque puits dédié.
Utiliser le NF-Water pour le témoin réactif.

Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.
Le programme suivant a été développé pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantStudio5, Step-one…) d'Applied Biosystems (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour les MX3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics, pour le Rotor-Gene Q de Qiagen, pour le CFX96 et Chromo 4 de Biorad, pour le MIC de BioMolecular System.

Programme ADN standard	
2 min. 50°C	
10 min. 95°C	
15 sec. 95°C*	45 cycles
60 sec. 60°C**	

*30 sec 95°C pour MX3000 et MX3005P.
**Lecture et paramètres pour l'acquisition de la fluorescence :

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	530	549
ROX	575	602

Note : Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive lue dans le spectre du ROX pour les appareils ABI.

Contacter votre représentant commercial ou le service client (support.pcr@biox.com) pour tout autre modèle de thermocycleur.

H. Interprétation des résultats

1. Validation et interprétation des résultats qualitatifs

Afficher l'ensemble des courbes et positionner la ligne de seuil pour chaque fluorochrome.

a. Validation de l'essai

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus.
Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour le CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
Témoin réactif (NTC)	Non	Oui/Non*	Absence de contamination pour l'amplification
PARATB CTL+	Oui	Oui/Non*	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Oui	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui	Etapes d'extraction et d'amplification
Témoin fèces positif quantifié	Oui+/-3Ct	Oui	Etapes d'extraction et d'amplification

*En fonction de l'utilisation de l'EPC-Amp.

b. Interprétation des résultats

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM et HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	Cible *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui/Non	Détecté
Non	Non	Non déterminé

« Non déterminé » : absence de courbe d'amplification caractéristique.
Causes possibles :
PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme, absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) et/ou
Déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).
Actions conseillées :
Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10ème en eau Nucléase-free ;
Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

2. Validation et interprétation des résultats quantitatifs

a. Gamme d'étalonnage

Dilution PARATB CTL+Q	Concentration (Copies IS900/PCR)	Amplification Cible	Validation de
Pure	10^6	Oui	Amplification de la cible Paratb et de la droite d'étalonnage
1/10	10^5	Oui	
1/100	10^4	Oui	
1/1000	10^3	Oui	
1/10000	10^2	Oui	
1/100000	10	Oui	

Pour l'interprétation quantitative des résultats, établir une droite de calibration (nombre de cycles = f (Log concentration), calculer l'équation de la droite ($y = ax + b$) et vérifier l'efficacité de la PCR ($Eff\% = \left(10^{\left(\frac{-1}{a}\right)} - 1\right) \times 100$).
La droite d'étalonnage est valide, si :

- Les 6 points de la gamme sont amplifiés. Néanmoins, un point de la gamme pourra être enlevé si ce point n'est pas l'un des 2 extrêmes.
- Le coefficient de corrélation R^2 est supérieur à 0,9.
- L'efficacité est comprise entre 75 et 125%.

b. Interprétation de la quantification

La quantification d'un échantillon positif est possible uniquement dans le domaine de quantification de la méthode utilisée (cf. dossier de validation).

Amplification FAM	Statut de l'échantillon
Aucun signal	Non détecté Acide nucléique non détecté
Signal < $LQ_{METHODE}$	Détecté Acide nucléique détecté en quantité inférieure à la $LQ_{METHODE}$
$LQ_{METHODE}$ < signal < LQ_{max}	Détecté Acide nucléique quantifiable
Signal > LQ_{max}	Détecté Acide nucléique détecté en quantité supérieure à la LQ_{max}

Lorsque l'échantillon est « quantifiable », la concentration est déterminée à l'aide de l'équation de la gamme étalon :

$$x = 10^{\left(\frac{y-b}{a}\right)} \times F$$

Où x : concentration en Equivalent Génome/gramme de fèces
y : valeur de Ct en FAM de l'échantillon positif à quantifier
b : origine à l'ordonnée de la droite
a : pente de la droite
F : facteur multiplicateur

Pour déterminer un nombre Equivalent Génome/gramme de fèces, il est nécessaire d'utiliser un facteur multiplicateur *(F)* selon le protocole utilisé ci-dessous :

Protocole ADIAMAG avec ADIAFILTER	$F=2,7$
Protocole ADIAMAG avec ADIAPREP	$F=5,35$

Bio-X Diagnostics propose, sur demande au service client, un fichier Excel permettant l'analyse quantitative.

Références bibliographiques

- Collins, J. D. *et al.,* Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces, Vet. Microbiol. (1993).
- Beinhauerova, M., *et al.* Development of a reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative PCR. *Sci Rep* (2021).
- Kralik P., *et al.*; Evidence of passive faecal shedding of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in a Limousin cattle herd. Vet J (2014).
- U47-600 : Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

Table des symboles

Symbole	Signification
REF	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
LOT	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
VET	Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière

Notes

1 Extraire les acides nucléiques avec

Adia X Mag →

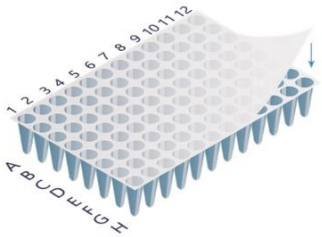
Scan me to discover Adiamag™

Si utilisation de l'EPC-Ext:

2 Répartir **20 µL** de réactif d'amplification **A5**

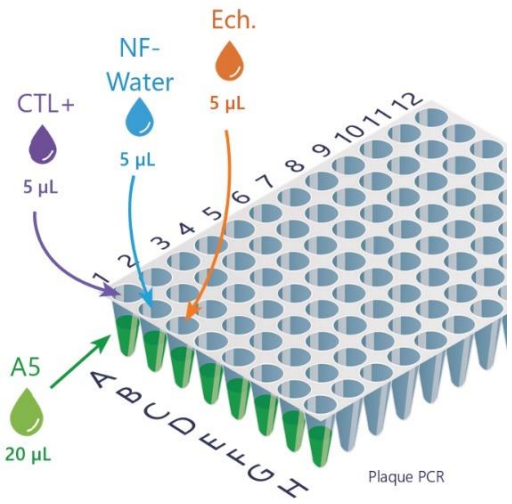
3 Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques, **CTL+** et **NF-Water**

4 Sceller les puits

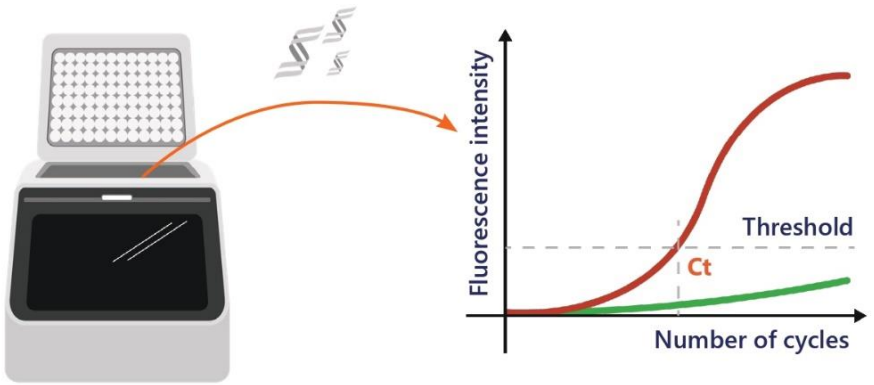


Si non-utilisation de l'EPC-Ext:

2 Préparer un prémélange de **20 µL** de réactif d'amplification **A5** + **1 µL** d'**EPC-Amp**
Répartir **20 µL** du prémélange



5 Démarrer l'analyse PCR



* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.

Contact us
support.pcr@biox.com
www.biox.com +32 (0) 84 32 23 77
Bio-X Diagnostics
38, rue de la Calestienne
5580 Rochefort (Belgium)