



ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION DE *COXIELLA BURNETII* PAR
AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

Référence :

AD1143-100 (100 réactions)



NOTE

Les fluorochromes présents dans ce produit sont vendus sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par des brevets, soit délivrés, soit en cours de demande, aux Etats Unis et dans le monde entier. La licence couvre le Diagnostic Moléculaire Vétérinaire.

ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	But de l'essai.....	4
2.	Pathogène.....	4
3.	Performance du test PCR.....	4
4.	Les prélèvements.....	4
5.	Description et principe du test.....	4
III.	MATERIEL ET REACTIFS	6
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	6
2.	Validité et conservation.....	6
3.	Utilisation des contrôles fournis dans le kit.....	6
A.	Utilisation de l'« EPC-Ext ».....	6
B.	Utilisation du « COX CTL+ ».....	6
4.	Matériel nécessaire mais non fourni.....	7
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS	8
1.	Précautions.....	8
2.	Réception des prélèvements.....	8
3.	Conservation des échantillons et des extraits d'ADN.....	8
4.	Préparation des prélèvements.....	8
A.	Le placenta.....	8
B.	Les écouvillons vaginaux, cervicaux.....	9
C.	Le lait.....	9
D.	Les organes (tissu fœtal).....	9
E.	Le liquide fœtal.....	9
F.	Les fèces.....	9
5.	Témoins à inclure.....	10
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION	11
1.	Avec le Kit QIAamp® DNA Mini kit.....	11
2.	Avec le Kit NucleoSpin® Tissue.....	12
3.	Avec le Kit Billes magnétiques ARN/ADN.....	13
VI.	AMPLIFICATION	14
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS	15
1.	Définitions.....	15
2.	Validation et interprétation des résultats qualitatifs.....	15
A.	Validation de l'essai.....	15
B.	Interprétation des résultats.....	16
3.	Validation et interprétation des résultats quantitatifs.....	16
A.	Validation de la gamme d'étalonnage et des témoins.....	16
B.	Expression du résultat des échantillons.....	17
4.	Validation et interprétation des résultats de la PCR relative.....	18
A.	Validation de l'essai.....	18
B.	Expression du résultat des échantillons.....	18
VIII.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	20
IX.	INDEX DES SYMBOLES	21

I. Historique des révisions

N/A	Non Applicable (première publication)
Correction	Correction des anomalies du document
Modification technique	Addition, révision et/ou suppression d'information liée au produit
Administratif	Modifications non techniques notables pour l'utilisateur

NB : toute modification mineure, typographique, grammaticale et de mise en page ne figurent pas dans l'historique des révisions.

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2013/11	NF143-07	Correction	Correction « Témoin positif cible d'extraction dosé à 10 ⁴ <i>C. burnetii</i> /ml », en page 10, § IV-5.
2013/11	NF143-07	Modification technique	Ajout du paragraphe « Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN », en page 13, § V-3.
2013/11	NF143-07	Modification technique	Ajout du paragraphe « Définitions », en page 15, § VII-1.
2014/12	NF143-08	Modification technique	Ajout du tableau des pictogrammes, en page 19.
2014/12	NF143-08	Modification technique	Suppression de la référence ADI143-50 (50 réactions)
2016/07	NF143-09	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF143-09	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF143-09	Modification technique	Ajout tableau types de prélèvements §I.4.
2017/01	NF143-10	Modification technique	Ajout interprétation des résultats en PCR relative
2018/05	NF143-11	Modification technique	Modification de l'intervalle associé à la valeur seuil pour l'interprétation de résultat en PCR relative §VII.4.B Précision au sujet des mélanges d'écouvillons page 4, §II.4.
2018/05	NF143-11	Administratif	Mise à jour de l'adresse d'ADIAGENE page 21, pied de page
2018/09	NF143-12	Correction	Modification des tableaux d'interprétation des résultats de la PCR quantitative et de la PCR relative Modification de la référence « Billes magnétiques ADN/ARN » OC-MNPACKK96 par NADI001.

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME permet de détecter et de quantifier *Coxiella burnetii* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon, de prélèvements de tissu, de fèces, de liquide fœtal et de lait de bovin, d'ovin et de caprin.

2. Pathogène

C. burnetii est une bactérie à Gram négatif, intracellulaire obligatoire, responsable de la fièvre Q (Burnet and Freeman, 1937 ; Cox, 1938).

La maladie existe dans le monde entier. *C. burnetii* est capable d'infecter une vaste gamme d'hôtes. La fièvre Q est une **zoonose** (pathologie transmissible à l'homme) essentiellement transmise par les ovins, les bovins et les caprins. La transmission se fait surtout par voie respiratoire par les aérosols émis lors des mises-bas ou lors des épandages de fumier. *C. burnetii* peut provoquer des avortements chez les animaux, occasionnant des pertes économiques dans les élevages. Les propositions de contrôle consistent essentiellement en des précautions vis à vis des femelles en gestation et des produits de mise-bas, la gestion du fumier, la gestion de la tonte de la laine. La vaccination (avec un vaccin de phase I) présente un intérêt mais il apparaît nécessaire d'utiliser des méthodes de contrôle combinées (Scientific Opinion on Q fever. EFSA Journal, 2010 ; 8(5) :1595 [114pp]).

3. Performance du test PCR

Ce test a été évalué sur plus de 130 échantillons issus de différents organismes présents en particulier chez les ruminants ou de microorganismes phylogénétiquement proches de *Coxiella* en particulier *Legionella*. Aucune réaction croisée n'a été observée.

La limite de détection de la PCR est de 1,5 *Coxiella burnetii* / 5µl PCR.

La limite de quantification de la PCR est de 2 *Coxiella burnetii* / 5µl PCR.

L'exactitude de la PCR est de $\pm 0,25 \log_{10}$.

4. Les prélèvements

Ce test peut être utilisé pour la détection et la quantification de *C. burnetii* chez les bovins, caprins et ovins à partir de :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon (placentaire, vaginal...)	<input checked="" type="checkbox"/>	3
Tissu (placenta, tissus fœtaux...),	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Fèces	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Liquide fœtal	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Lait	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

* Dépend de la situation épidémiologique et de la qualité de l'échantillon. Le nombre est strictement de 3 écouvillons dans le cas du mélange pour le diagnostic d'avortements (recommandations nationales françaises : encadré au § VII.4.B).

5. Description et principe du test

Ce test repose sur l'amplification enzymatique de gène ou technique PCR.

Les produits amplifiés sont détectés en temps réel grâce au marquage spécifique de sondes d'hydrolyse (technologie 5'-exonucléase).

Le kit ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME peut détecter simultanément

- La cible *Coxiella burnetii* (sonde marquée en FAM) spécifique d'une séquence du gène l'S1111
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène naturellement trouvée dans le génome des cellules bovines, ovines ou caprines (sonde marquée avec un fluorochrome de même spectre que VIC et HEX). Contrôle interne d'extraction endogène = Témoin positif non cible endogène (cf. Norme NF U47 600-1)

Le témoin positif *Coxiella* « COX CTL+ » contient une quantité d'ADN connue de *Coxiella burnetii*, il permet la quantification des prélèvements positifs grâce à l'élaboration d'une gamme composée de 5 points (courbe d'étalonnage de l'essai PCR). L'unité de mesure est le nombre d'équivalent génomes (ou nombre de bactéries) par ml.

Une extraction et une purification des ADN totaux sont réalisées à partir des prélèvements de ruminants selon le mode opératoire validé. L'extraction d'ADN se fait au moyen de réactifs mis au point et commercialisés par la société QIAGEN (Courtaboeuf, France) ou MACHEREY-NAGEL (Hoerd, France). Les ADN extraits sont amplifiés avec le kit ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME.

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	ADI143-100
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tubes verts
COX CTL+	Contrôle positif <i>Coxiella burnetii</i>	1 tube violet
EPC-Ext	Contrôle exogène non cible d'extraction	2 x 300 µl tubes jaunes

2. Validité et conservation

A réception, le kit doit être stocké à <-15°C.

Il est recommandé d'aliquoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongelations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Les réactifs temps réel sont sensibles à la lumière : les conserver à l'obscurité.

Le réactif « A5 » est prêt à être utilisé pour la réaction PCR.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Utilisation des contrôles fournis dans le kit

A. Utilisation de l'« EPC-Ext »

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 décongelations.

Pour chaque extraction de fèces ou de matrice acellulaire, nous recommandons d'ajouter **5 µl d'EPC-Ext par échantillon.**

B. Utilisation du « COX CTL+ »

Ce témoin est à utiliser avec précaution, sa forte concentration en cible peut être une source de contamination.

Le tube contient un standard d'ADN plasmidique incluant la cible *C. burnetii* quantifiée en EG (équivalent génome) /ml. Ce témoin a été raccordé au MRE-ADN dosé (souche Nine-Mile, LNR-FQ).

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « COX CTL+ » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C. Le tube « COX CTL+ » préparé ne doit pas subir plus de 3 décongelations.

Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de « COX CTL+ » dans un des puits.

Réaliser une gamme de dilution de raison 10 du témoin « COX CTL+ » préparée extemporanément dans de l'eau Nuclease-free (Ne pas congeler les dilutions) :

<i>Dilution de la gamme titrée</i>	<i>Concentration en ADN C. burnetii/ml</i>
Pure	4x10 ⁶
1/10	4x10 ⁵
1/100	4x10 ⁴
1/1000	4x10 ³
1/10000	4x10 ²

Selon le type de PCR, les témoins à inclure en PCR sont détaillés dans le §IV.5.

4. Matériel nécessaire mais non fourni

Attention : le consommable utilisé doit être Nuclease-free (par exemple autoclavé deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C)

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermées de qualité optique. La liste des thermocycleurs utilisables est présentée au chapitre V.
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Centrifugeuse pour microtubes, tubes de 15 ml
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Ethanol 96-100%
- Eau déminéralisée stérile
- Tampon PBS

- **Kit d'extraction d'ADN en colonne individuelle**
 - QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)
 - NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, 50 tests : réf.740952.50 ou 250 tests : réf. 740952.250)

Ou

- **Kit d'extraction d'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate (Bio-X Diagnostics ; 2*96 tests ; NADI001)**

Se référer à la version de notice NFKF indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

IV. Traitement des échantillons et des témoins

Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.

1. Précautions

Adiagène a validé ce test avec les kits d'extraction d'ADN des sociétés Qiagen, Macherey-Nagel selon la norme NF U47-600-2. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés avec une validation préalable.

Respecter les recommandations des fabricants pour la conservation, la préparation et l'utilisation des réactifs contenus dans les kits d'extraction.

Certains kits contiennent et/ou nécessitent l'utilisation de composés toxiques. Ces produits doivent être manipulés avec des gants et sous hotte chimique.

Nous conseillons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude et la précision des micropipettes utilisées. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire.

La réaction PCR génère de grandes quantités d'ADN amplifié. Quelques molécules de produits amplifiés peuvent générer des résultats positifs. Il est donc important de bien séparer la zone d'analyse des produits amplifiés de la zone où sont manipulés les échantillons à analyser et de ne pas ouvrir les tubes après amplification.

Les échantillons à analyser doivent être manipulés et éliminés comme des déchets biologiques. **Prendre toutes les dispositions de sécurité et de confinement requises pour la manipulation des agents biologiques concernés** (Arrêté du 16 juillet 2007). Par exemple, il convient de traiter tout prélèvement inconnu a minima en condition de niveau de confinement II jusqu'à l'étape de lyse de l'extraction des ADN totaux (PSM type II, EPI tels que double gants, masque FFP3 et blouse jetable, nettoyage du PSM à l'aide d'un spray désinfectant virucide et sporicide, inactivation des déchets sous PSM et gestion des déchets en tant que DASRI).

Attention ! Les placentas sont susceptibles de contenir une très grande quantité de bactéries. Les prélèvements susceptibles de contenir *C. burnetii* doivent être manipulés avec ces précautions sous PSM de type II et en laboratoire L3.

Nous vous recommandons de faire des fractions aliquotées d'eau déminéralisée et de tampon PBS, de les autoclaver (25 minutes à +120°C) et de changer de tube d'eau lors de chaque manipulation afin d'éviter toute contamination.

2. Réception des prélèvements

Nettoyer et désinfecter les étuis, tubes et pots contenant les prélèvements, à l'aide d'un spray désinfectant virucide et sporicide, avant d'identifier et de manipuler sous PSM ou stocker. Vérifier que l'état n'est pas altéré et que le prélèvement est analysable.

3. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN

Les échantillons se conservent un ou deux jours à +2/8°C. Au-delà de 2 jours, il est conseillé de les conserver à <-15°C.

Les ADN extraits sont des molécules sensibles. Les extraits d'ADN peuvent être stockés dès la fin de l'extraction à +2/8°C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

Prendre soin de conserver le restant des suspensions de type individuel ou mélange et des ADN pour une reprise d'essai éventuelle.

4. Préparation des prélèvements

A. Le placenta

Afin d'éliminer les contaminants de surface, il est recommandé de tremper les cotylédons à échantillonner dans un bain d'alcool iodé (ou d'alcool 70%) pendant quelques secondes et de les transférer dans une boîte de Pétri.

Inciser chaque cotylédon avec un scalpel. Frotter à l'intérieur des trois cotylédons à l'aide de trois écouvillons secs.

Introduire les trois écouvillons dans un tube stérile de 5 ml préalablement identifié et couper si besoin le manche des écouvillons. Ajouter **3 ml** de tampon PBS 1X pH 7,4 aux écouvillons. Bien homogénéiser environ 30 secondes.

Les 3 cotylédons d'un même placenta ainsi rassemblés en un volume de 3 ml permettent ensuite une analyse de type mélange. Prélever **200 µl** de surnageant et les placer dans un microtube préalablement identifié.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

B. Les écouvillons vaginaux, cervicaux

Le type d'écouvillon utilisé est un écouvillon sec, avec embout viscosse, disposant d'une tige souple en plastique (par ex., Ref 155C de COPAN ou produits équivalents s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats).

Pour une analyse individuelle :

Introduire l'écouvillon dans un microtube de 2 ml préalablement identifié et couper, si besoin, la tige de l'écouvillon. Le ciseau est nettoyé dans un bain de désinfectant (alcool 70°C ou Steranios 2%) entre chaque opération. Ajouter **1 ml** de tampon PBS 1X pH 7,4 à l'écouvillon. Bien homogénéiser environ 30 secondes. Collecter la suspension dans un nouveau tube pour stockage. Prélever **200 µl** de surnageant et les placer dans un microtube préalablement identifié.

Dans le cas de l'écouvillon cervical, la tige de l'écouvillon a été coupée lors de la réalisation du prélèvement par le vétérinaire : ajouter **1 ml** de PBS directement dans l'étui de l'écouvillon.

Pour une analyse en mélange (seulement chez les petits ruminants) :

Introduire trois écouvillons dans un tube stérile de 5 ml préalablement identifié et couper si besoin la tige des écouvillons. Ajouter **3 ml** de tampon PBS 1X pH 7,4 aux écouvillons. Bien homogénéiser environ 30 secondes. Collecter la suspension dans un nouveau tube pour stockage. Prélever **200 µl** de surnageant et les placer dans un microtube préalablement identifié.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

C. Le lait

Homogénéiser et prélever **200 µl** dans un microtube préalablement identifié.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

D. Les organes (tissu foetal)

Peser **20 à 30 mg** d'organe, les lacérer au scalpel, puis les placer dans un microtube préalablement identifié.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

E. Le liquide foetal

Homogénéiser et prélever **200 µl** dans un microtube préalablement identifié.

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

F. Les fèces

Peser **1 g** de fèces et le mettre dans un tube stérile de 10 ou 15 ml préalablement identifié.

Ajouter **5 ml** de tampon PBS 1X pH 7,4.

Bien homogénéiser environ 30 secondes.

Centrifuger à 3000 g durant 2 minutes.

Prélever **200 µl** de surnageant et les placer dans un microtube préalablement identifié.

Ajouter **5 µl d'« EPC-Ext » par échantillon.**

Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN.

5. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats.

Les témoins sont à inclure par série d'analyse. Une série est définie comme un ensemble d'échantillons pour lesquels chaque étape a été réalisée dans les mêmes conditions.

L'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelles que soient les matrices, est validé grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit

- Le contrôle interne endogène (GAPDH) naturellement présent dans le prélèvement permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « COX CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés :

- **Témoin négatif d'extraction (obligatoire)**

Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, au moins un témoin négatif doit être intégré dans chaque série d'extraction. Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou du tampon de dilution (par exemple du PBS 1X).

- **Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)**

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant *C. burnetii*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou de la solution MRE bactéries du LNR-FQ, ANSES Sophia Antipolis. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la LD_{METHODE} (par exemple il pourra être dosé à 10⁴ *C. burnetii*/ml ou 1-100X LD_{METHODE}). Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité et la justesse des résultats obtenus.

- **MRSI (obligatoire pour la PCR relative)**

Le matériel de référence au seuil d'interprétation (MRSI) est un témoin positif cible dosé introduit dans chaque série d'extraction. Celui-ci est obtenu à partir de la solution MRE bactéries du LNR-FQ, ANSES Sophia Antipolis, dilué dans du tampon de dilution PBS 1X.

Le MRSI doit être dosé à 10⁴ *C. burnetii*/ml si la série d'extraction contient des écouvillons en analyse individuelle et à 10³ *C. burnetii*/ml si elle contient des écouvillons en analyse en mélange.

Bilan des témoins à inclure selon le type de PCR :

<i>Témoins</i>	<i>Concentration en ADN C. burnetii/ml</i>	<i>A introduire à étape :</i>	<i>PCR qualitative</i>	<i>PCR quantitative</i>	<i>PCR relative</i>
COX CTL+ pur (LQ _{MAX PCR})	4x10 ⁶	Amplification	Non	Oui	Non
COX CTL+ 1/10	4x10 ⁵	Amplification	Non	Oui	Non
COX CTL+ 1/100	4x10 ⁴	Amplification	Non	Oui	Non
COX CTL+ 1/1000	4x10 ³	Amplification	Oui	Oui	Non
COX CTL+ 1/10000 (LQ _{PCR})	4x10 ²	Amplification	Non	Oui	Oui
Témoin réactif d'amplification	0	Amplification	Oui	Oui	Oui
Témoin négatif extraction	0	Extraction	Oui	Oui	Oui
Témoin positif cible d'extraction	10 ⁴	Extraction	Recommandé*	Recommandé*	Non
MRSI	10 ⁴ et /ou 10 ³	Extraction	Non	Non	Oui

*recommandé par le LNR Fièvre Q, ANSES Sophia-Antipolis, France

V. Extraction et purification

1. Avec le Kit QIAamp® DNA Mini kit

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Avant le début de l'extraction, allumer un système chauffant à +70°C (ou 56°C).

Préparation de l'échantillon	Prendre 200 µl de surnageant ou 20/30 mg d'organe lacéré, préparé comme décrit précédemment (<i>cf. § III.4.</i>)
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K . Homogénéiser. Incuber 30 minutes à +70°C (ou 1 nuit à +56°C).
	Ajouter 200 µl de tampon AL . Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C .
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d'éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>
1^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
2^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon AE . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C .

2. Avec le Kit NucleoSpin® Tissue

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Avant le début de l'extraction, allumer un système chauffant à +70°C (ou 56°C).

Préparation de l'échantillon	Prendre 200 µl de surnageant ou 20/30 mg d'organe lacéré, préparé comme décrit précédemment (<i>cf.</i> § III.4)
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon T1 et 25 µl de protéinase K . Homogénéiser. Incuber 30 minutes à +70°C (ou 1 nuit à +56°C).
	Ajouter 200 µl de tampon B3 . Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C .
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d'éthanol 100% . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou à l'aide d'un agitateur de type vortex (~15 secondes).
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>
1^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
2^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon B5 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon BE . Incuber ~1 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.

3. Avec le Kit Billes magnétiques ARN/ADN

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

VI. Amplification

a - Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, y compris les témoins utilisés :

Témoins	PCR qualitative	PCR quantitative	PCR relative
COX CTL+ pur (LQ _{max})	Non	Oui	Non
COX CTL+ 1/10	Non	Oui	Non
COX CTL+ 1/100	Non	Oui	Non
COX CTL+ 1/1000	Oui	Oui	Non
COX CTL+ 1/10000 (LQ _{PCR})	Non	Oui	Oui
Témoin réactif d'amplification	Oui	Oui	Oui
Témoin négatif extraction	Oui	Oui	Oui
Témoin positif cible d'extraction	Recommandé*	Recommandé*	Non
MRSI	Non	Non	Oui
Nb total de témoin	3 (ou 4)	7 (ou 8)	4

*recommandé par le LNR Fièvre Q, ANSES Sophia-Antipolis, France

b - Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Bien homogénéiser. Répartir **20 µl** dans chacun des tubes PCR ou des puits de la plaque PCR avec une pipette munie de pointes Nuclease-free.

c- **Replacer immédiatement le tube « A5 » à <-15°C et à l'obscurité.**

d- Pour chaque échantillon, le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter **5 µl** d'extrait purifié aux **20 µl** de réactif « A5 ».

Pour le témoin réactif d'amplification (NTC), ne rien ajouter au réactif « A5 ».

Pour les autres témoins, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3.B. et § III.5.) aux **20 µl** de réactif « A5 ».

Replacer immédiatement les extraits d'ADN purifiés à +2/8°C ou <-15°C. Eliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible *C. burnetii* est lue en FAM. Le contrôle interne est lu en VIC ou HEX. Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue pendant l'étape d'élongation (1 minute à 60°C).

Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism** (type 7500, Step-one...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour le **Rotorgene** de **Qiagen** et pour le **Chromo 4** de **Biorad** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Le programme ci-dessous concerne les **MX3000P** et **MX3005P** de **Stratagène** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

30 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Roche diagnostic : LightCycler 2*, LightCycler 480*

* **NOTE**: L'utilisation de thermocycleurs *LightCycler* nécessite au préalable une manipulation de calibration. Nous fournissons la procédure et les réactifs nécessaires à cette calibration.

Contactez-nous si vous souhaitez utiliser d'autres appareils.

VII. Interpretation des résultats

1. Définitions

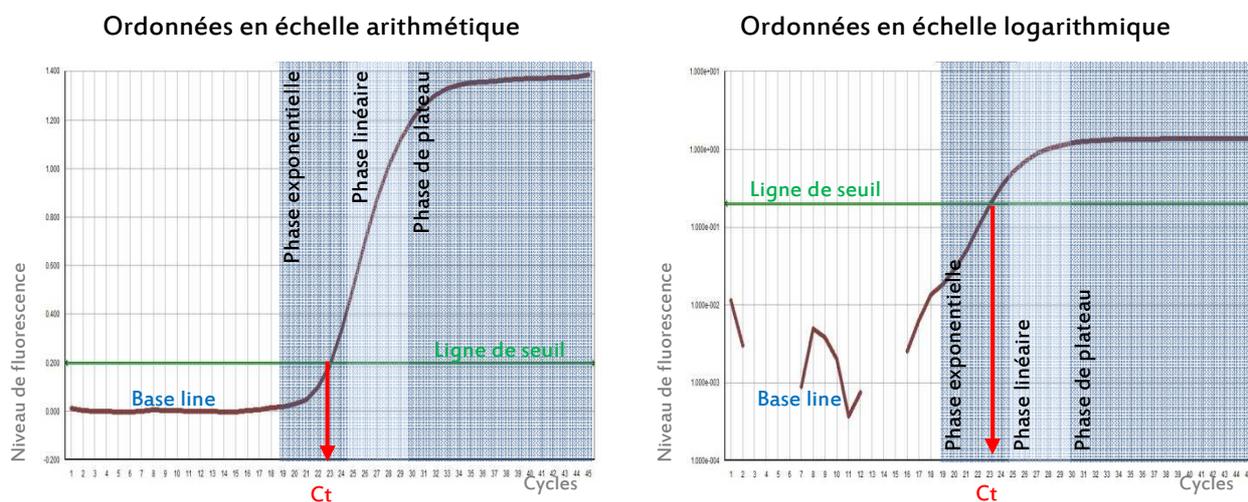
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

Le terme « **courbe d'amplification caractéristique** » qualifie une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, une phase linéaire et une phase de plateau.

La « **ligne de seuil** » ou « **threshold line** » doit être placée au-dessus de la ligne de base, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique ou d'un ensemble de courbes d'amplification caractéristiques.

Le « **cycle seuil** » ou « **threshold cycle** » (**Ct**) d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, à l'abscisse du point d'intersection entre la ligne de seuil et la courbe d'amplification. La valeur de Ct exprimée par l'appareil pour chaque puits dépend ainsi de la position de la ligne seuil et de la charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR.

Exemple d'une courbe d'amplification caractéristique :



2. Validation et interprétation des résultats qualitatifs

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en VIC ou HEX.

A. Validation de l'essai

L'amplification est considérée comme valide si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins :

Témoins	Analyse qualitative	
	Amplification en FAM	Amplification en VIC/HEX
COX CTL+ 1/1000	Oui	Non
Témoin réactif d'amplification	Non	Non
Témoin négatif extraction en PBS/Matrice	Non	Non/Oui
Témoin positif cible d'extraction en PBS/Matrice	Oui	Non/Oui

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« COX CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

B. Interprétation des résultats

L'extraction de l'ADN et l'amplification sont considérées comme **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en *C. burnetii* (FAM) et/ou en contrôle interne (VIC ou HEX).

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Non
Résultat	Négatif	Positif	Positif	Non déterminé A refaire

L'échantillon est considéré comme **Négatif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC ou HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM (exemple A).

L'échantillon est considéré comme **Positif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemple B). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié (exemple C).

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple D) indique une déficience de l'extraction de l'ADN (perte ou destruction de l'ADN) ou une PCR temps-réel défectueuse (présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, erreur de programme ou absence d'échantillon). Dans ce cas, il est conseillé de refaire le test en utilisant l'extrait d'ADN pur et dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau Nuclease-free. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction de l'ADN total de l'échantillon est souhaitable.

3. Validation et interprétation des résultats quantitatifs

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en VIC ou HEX.

A. Validation de la gamme d'étalonnage et des témoins

Les résultats des témoins doivent être tous valides :

Témoins	Quantité de <i>C. burnetii</i> /ml	Amplification en FAM	Amplification en VIC/HEX
COX CTL+ pur (LQ _{MAX PCR})	4x10 ⁶	Oui	Non
COX CTL+ 1/10	4x10 ⁵	Oui	Non
COX CTL+ 1/100	4x10 ⁴	Oui	Non
COX CTL+ 1/1000	4x10 ³	Oui	Non
COX CTL+ 1/10000 (LQ _{PCR})	4x10 ²	Oui	Non
Témoin réactif d'amplification	0	Non	Non
Témoin négatif d'extraction en PBS/Matrice	0	Non	Non/Oui
Témoin positif cible d'extraction en PBS/Matrice	10 ⁴	Oui	Non/Oui

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« COX CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Si les résultats correspondent au tableau ci-dessus, l'analyse des échantillons est possible.

Pour l'interprétation quantitative, vérifier l'efficacité de la PCR (Eff). Les valeurs des Ct obtenues pour les dilutions successives doivent décroître proportionnellement à la dilution (3,33 Ct pour une dilution au 1/10). De façon générale les logiciels fournis avec les appareils permettent d'établir une droite de calibration (nombre de cycles = f (Log concentration)) et calculent l'équation de la droite ($y = ax + b$) et l'efficacité de la PCR $Eff\% = \left(10^{\frac{-1}{a}} - 1\right) \times 100$

Avant l'analyse des résultats, la gamme doit être valide. Les points suivants doivent être strictement respectés :

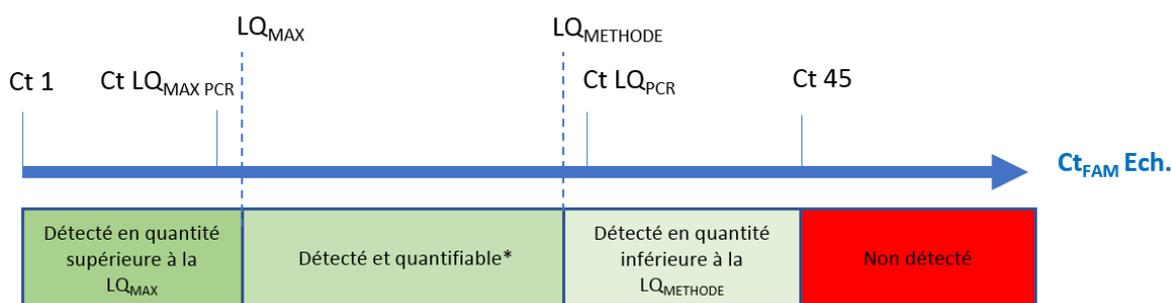
- Les 5 points de la gamme doivent être amplifiés. Néanmoins un point de gamme pourra être enlevé si ce point n'est pas l'une des 2 extrêmes.
- Le coefficient de corrélation R² doit être supérieur à 0,9
- L'efficacité doit être comprise entre 85 et 115%
- Répartition des points doit être homogène.

Pour faciliter l'expression et l'interprétation d'un échantillon, un fichier informatique peut être fourni sur demande.

B. Expression du résultat des échantillons

L'expression du résultat d'un échantillon est représentée dans le tableau ou schéma suivant :

Exemple	A	B	C	D	E
Amplification FAM	Oui $Ct_{éch.} < LQ_{MAX}$	Oui $LQ_{MAX} < Ct_{éch.} < LQ_{METHODE}$	Oui $Ct_{éch.} > LQ_{METHODE}$	Non	Non
Amplification VIC/HEX	Oui/Non	Oui/Non	Oui/Non	Oui	Non
Expression du résultat	Positif : Déte�té en quantité supérieure à la LQ_{MAX}	Positif : Déte�té et quantifiable*	Positif : Déte�té en quantité inférieure à la $LQ_{METHODE}$	Négatif : Non déte�té	Non déterminé A refaire



*dans le domaine de quantification selon la méthode utilisée (CF. dossier de validation du kit).
Pour faciliter l'expression et l'interprétation quantitative d'un échantillon, un fichier informatique peut être fourni sur demande.

L'échantillon est considéré comme **positif** pour *Coxiella burnetii* si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM. Le contrôle interne peut être co-amplifié en VIC/HEX. Un phénomène de compétition peut aussi survenir si l'échantillon est très fortement chargé en cible *C. burnetii* (Remarque : dans le cas où il s'agit d'un phénomène de compétition, il n'est pas nécessaire de répéter l'analyse de l'échantillon).

Lorsque l'échantillon est « quantifiable », la concentration en *C. burnetii* par matrice 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 *C. burnetii*
 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

Le facteur multiplicateur est déterminé selon la matrice de l'échantillon et la méthode d'extraction :

Matrice	Facteur multiplicateur (F) selon la méthode d'extraction		Unité
	QIAamp® DNA Mini Kit ou NucleoSpin® Tissue	Billes magnétiques ADN/ARN	
Echantillon liquide (écouvillon vaginal, placentaire et lait)	1	0,6	<i>C. burnetii</i> / ml
Fèces	5	3	<i>C. burnetii</i> / g
Tissu	10	3	<i>C. burnetii</i> / g

L'échantillon est considéré comme **négatif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC/HEX sans qu'il y ait d'amplification en FAM.

L'absence totale de courbes d'amplification caractéristique pour un échantillon indique une PCR temps réel défectueuse (présence d'inhibiteurs de la PCR, faible charge cellulaire lors de la prise d'essai, erreur de programme...). Il est conseillé de refaire le test en double en utilisant l'extrait d'ADN pur et dilué au 1/10^{ème} dans du tampon d'éluion du kit d'extraction de façon à diluer les éventuels inhibiteurs de PCR. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé et si nécessaire, une nouvelle extraction de l'ADN total de l'échantillon est souhaitable.

Prendre soin d'intégrer le facteur de dilution au 1/10 dans la nouvelle quantification.

4. Validation et interprétation des résultats de la PCR relative

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en VIC ou HEX.

A. Validation de l'essai

Les résultats des témoins doivent être tous valides :

Témoins	Quantité de <i>C. burnetii</i> /ml	Amplification en FAM	Amplification en VIC/HEX
COX CTL+ 1/10 000 (LQ _{PCR})	4x10 ²	Oui	Non
Témoin réactif d'amplification	0	Non	Non
Témoin négatif d'extraction en PBS/Matrice	0	Non	Non/Oui
MRSI analyse individuelle en PBS	10 ⁴	Oui	Non
MRSI analyse mélange en PBS	10 ³	Oui	Non

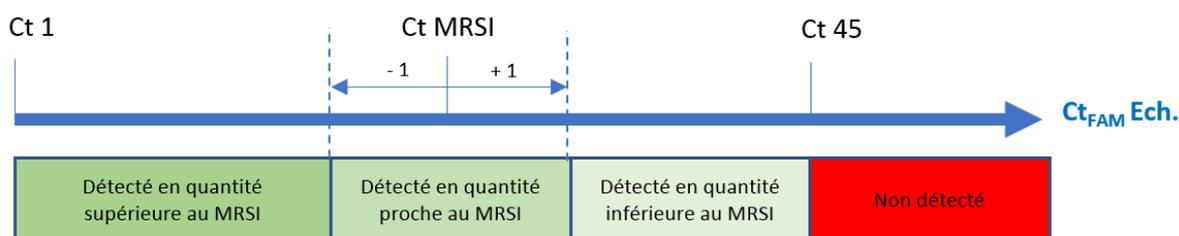
Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« COX CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Si les résultats correspondent au tableau ci-dessus, l'analyse des échantillons est possible.

B. Expression du résultat des échantillons

L'expression du résultat d'un échantillon est représentée dans le tableau ou schéma suivant :

Exemple	A	B	C	D	E
Amplification FAM	Oui Ct _{éch.} < Ct MRSI (-1Ct)	Oui Ct _{éch.} = Ct MRSI (+/-1Ct)	Oui Ct _{éch.} > Ct MRSI (+1Ct)	Non	Non
Amplification VIC/HEX	Oui/Non	Oui/Non	Oui/Non	Oui	Non
Expression du résultat	Positif: Déteécté en quantité supérieure au MRSI	Positif: Déteécté en quantité proche au MRSI	Positif: Déteécté en quantité inférieure au MRSI	Négatif: Non déteécté	Non déterminé A refaire



L'intervalle associé à la valeur seuil est de 1 Ct. Elle est définie par le LNR-FQ (Cf. Note de décision pour les résultats proches du seuil « clinique » du 26 octobre 2017). Dans cet intervalle, on mentionne que le résultat est proche du seuil. Par exemple : "Positif proche du seuil".

Selon la NS DGAL de septembre 2012, un avortement est lié à la fièvre Q lorsque la PCR quantitative sur un échantillon individuel donne un résultat supérieur ou égal au seuil de 10^4 *C. burnetii* par écouvillon (vaginal, cervical). Pour une analyse en mélange (3 écouvillons de 3 animaux ou 3 cotylédons différents d'un même placenta), le seuil est fixé à 10^3 *C. burnetii* par écouvillon. Selon le rapport ACERSA Mai 2007, un résultat positif sur les organes d'avorton (rate, poumon, foie) quelle que soit la quantité de bactéries présentes, signifie un avortement lié à *C. burnetii*.

L'échantillon est considéré comme **positif** pour *Coxiella burnetii* si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM. Le contrôle interne peut être co-amplifié en VIC/HEX. Un phénomène de compétition peut aussi survenir si l'échantillon est très fortement chargé en cible *C. burnetii* (Remarque : dans le cas où il s'agit d'un phénomène de compétition, il n'est pas nécessaire de répéter l'analyse de l'échantillon).

La valeur de Ct de l'échantillon positif est comparée à celle du MRSI. L'expression du résultat est définie selon le tableau ci-dessus.

L'échantillon est considéré comme **négatif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC/HEX sans qu'il y ait d'amplification en FAM.

L'absence totale de courbes d'amplification caractéristique pour un échantillon indique une PCR temps réel défectueuse (présence d'inhibiteurs de la PCR, faible charge cellulaire lors de la prise d'essai, erreur de programme...). Il est conseillé de refaire le test en double en utilisant l'extrait d'ADN pur et dilué au 1/10^{ème} dans du tampon d'élution du kit d'extraction de façon à diluer les éventuels inhibiteurs de PCR. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé et si nécessaire, une nouvelle extraction de l'ADN total de l'échantillon est souhaitable.

Prendre soin d'intégrer le facteur de dilution au 1/10 dans la nouvelle quantification.

VIII. Références bibliographiques

Burnet, F. M., and M. Freeman (1937). Experimental studies on the virus of Q fever. *Med. J. Aust.* 2:299-302

Cox, H. R. (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. III. Description of organism and cultivation experiments. *Public Health Rep.* 53:2270-2276

EFSA Journal, Scientific Opinion on Q fever, 2010 ; 8(5) :1595 [114pp].

Guide COFRAC LAB REF 08, Révision #02 : Expression et évaluation des portées d'accréditation. 21/12/2011. <http://www.cofrac.fr/documentation/lab-ref-08>

Norme AFNOR NF U47-600-1 (février 2015), Méthodes d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne - Partie 1 : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale.

Norme AFNOR NF U47-600-2 (février 2015), Méthodes d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne - Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.

Rapport ACERSA : Proposition de plan de maîtrise de la Fièvre Q dans les élevages cliniquement atteints (Mai 2007)

http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/documents/pdf/Plan_de_maitrise_FQ.pdf

IX. Index des symboles

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

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE et ADIAVET™ sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à ADIAGENE et/ou Bio-X Diagnostics ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.



**ADIAGENE**
9 rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

RCS 417 876 299
Tél. 33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com