



# ADIAVET™ ABORTION

VET

## OBJET DU TEST

Le kit ADIAVET™ ABORTION permet de détecter 4 pathogènes abortifs chez les ruminants (*Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus*, *Toxoplasma gondii* et *Anaplasma phagocytophilum*) par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon. Le kit ADIAVET™ ABORTION contient les réactifs de 4 références ADIAVET™ spécifiques à ces pathogènes (réf. ADI143-100, 418027, 418025, 418028 respectivement).

## PRINCIPE

Le kit ADIAVET™ ABORTION contient 4 solutions d'amplifications dont chacune repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques d'un pathogène et d'un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène.

	A5 COX	A5 CHLAM.A	A5 TOXO	A5 ANA PHA
Sonde marquée en FAM	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Chlamydia abortus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Sonde marquée en HEX ou équivalent	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH

Le témoin positif COX CTL+, fourni dans le kit, permet de quantifier *C. burnetii*.

## PRESENTATION

<b>Kit</b>
REF ADI661-4x50      Coffret de 4*50 tests

## COMPOSITION

REF ADI661-4x50		
A5 COX	..... solution d'amplification <i>Coxiella burnetii</i>	1 x 1000 µl tube à bouchon vert (Prêt à l'emploi)
A5 CHLAM.A	..... solution d'amplification <i>Chlamydia abortus</i>	1 x 1000 µl tube à bouchon jaune (Prêt à l'emploi)
A5 TOXO	..... solution d'amplification <i>Toxoplasma gondii</i>	1 x 1000 µl tube à bouchon bleu (Prêt à l'emploi)
A5 ANA. PHA	..... solution d'amplification <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	1 x 1000 µl tube à bouchon orange (Prêt à l'emploi)
COX CTL+	..... contrôle positif <i>Coxiella burnetii</i>	1 tube à bouchon vert strié (A reconstituer)
CHLAM.A CTL+	..... contrôle positif <i>Chlamydia abortus</i>	1 tube à bouchon jaune strié (A reconstituer)
TOXO CTL+	..... contrôle positif <i>Toxoplasma gondii</i>	1 tube à bouchon bleu strié (A reconstituer)
ANA. PHA CTL+	..... contrôle positif <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	1 tube à bouchon orange strié (A reconstituer)
NF-Water	..... nuclease-free Water	1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Prêt à l'emploi)

## CONDITIONS DE STOCKAGE

- **A réception, stocker le kit à une température inférieure à -15°C**
- **Les réactifs reconstitués doivent être aliquotés et stockés à une température inférieure à -15°C** jusqu'à la date de péremption du kit.
- **Stocker à l'abri de la lumière.**
- **Ne pas décongeler plus de 3 fois.**

## MATERIEL ET REACTIF NECESSAIRES MAIS 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 Nuclease-Free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-Free de 1,5 ml et 2 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Eau Nuclease-Free
- Kit d'extraction des acides nucléiques

## PRECAUTIONS D'UTILISATION ET DE SECURITE

- **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.
- 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).

## EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

Les ADN doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit. Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés par Bio-X Diagnostics.

Nom du produit	Fournisseur	Technologie d' extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG	Bio-X Diagnostics	Billes magnétiques	200 tests: réf. NADI003 800 tests: réf. NADI003-XL

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Écouvillon placentaire, vaginal...	<input checked="" type="checkbox"/>	3

\* dépend du pathogène recherché, de la qualité de l'échantillon et de la situation épidémiologique

D'autres kits d'extraction ou types de prélèvements peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur et selon les notices d'utilisation des kits ADIAVET™ spécifiques à ces 4 pathogènes (réf. ADI143-100, 418027, 418025, 418028 respectivement). Contacter votre représentant commercial ou votre service client.

## PREPARATION DES ECHANTILLONS

### 1. PREPARATION DES ECOUVILLONS

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 doit être 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.

Dans le cas de l'écouvillon cervical, si la tige de l'écouvillon a été coupée lors de la réalisation du prélèvement par le vétérinaire, ajouter **1 ml** de PBS 1X pH 7,4 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.

*Poursuivre la procédure d'extraction et de purification des acides nucléiques selon la notice du kit d'extraction ADIAMAG indiquée sur le certificat d'analyse du kit ADIAVET™ ABORTION.*

### 2. TEMOIN NEGATIF 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).

### 3. TEMOIN POSITIF « CIBLE » D'EXTRACTION (RECOMMANDE)

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la LD<sub>METHODE</sub>. Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité et la justesse des résultats obtenus.

### 4. MRSI COXIELLA BURNETII (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 10<sup>4</sup> *C. burnetii*/ml si la série d'extraction contient des écouvillons en analyse individuelle et à 10<sup>3</sup> *C. burnetii*/ml si elle contient des écouvillons en analyse en mélange.

## MODE OPERATOIRE

### 1. PREPARATION DES CONTROLES (CTL+)

1. Ajouter 200 µl de « NF-Water » par tube CTL+.
2. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.
3. Après reconstitution, aliquoter la solution et stocker la solution à une température inférieure à -15°C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.
4. Pour l'utilisation des CTL+, se reporter au paragraphe « AMPLIFICATION ».
5. Pour l'utilisation du COX CTL+ en gamme de quantification, réaliser, extemporanément, une gamme étalon en eau Nuclease-Free.

Dilution	Concentration ( <i>C. burnetii</i> /ml) du COX CTL+
Pure	4x10 <sup>6</sup>
1/10	4x10 <sup>5</sup>
1/100	4x10 <sup>4</sup>
1/1000	4x10 <sup>3</sup>
1/10000 (LQPCR)	4x10 <sup>2</sup>

Pour une analyse PCR **quantitative**, 5 µl de chaque dilution « COX CTL+ » seront utilisés par essai.

### 2. 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 à l'aide d'un agitateur de type vortex.
- Replacer les réactifs à une température inférieure à -15°C, après distribution.
- Les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8°C pendant 24 heures, puis à une température inférieure à -15°C.

#### ÉTAPE 1 : REPARTITION DE 20 µL DE CHAQUE REACTIFS D'AMPLIFICATION A5

Distribuer les 4 solutions d'amplification A5 en fonction du nombre d'échantillons et de contrôles.

#### ÉTAPE 2 : REPARTITION DE 5 µL D'ACIDES NUCLEIQUES ET DES CONTROLES DANS CHAQUE REACTIFS D'AMPLIFICATION SPECIFIQUES

Distribuer les acides nucléiques extraits des échantillons et les contrôles dans chaque puits dédié.

Ne rien ajouter pour le témoin négatif d'amplification (NTC).

#### ÉTAPE 3 : FERMER LES PUIITS AVEC UN FILM OU BARRETTES ADAPTES

#### ÉTAPE 4 : LANCEZ L'ANALYSE PCR

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 les MX3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics et pour le CFX96 de Biorad.

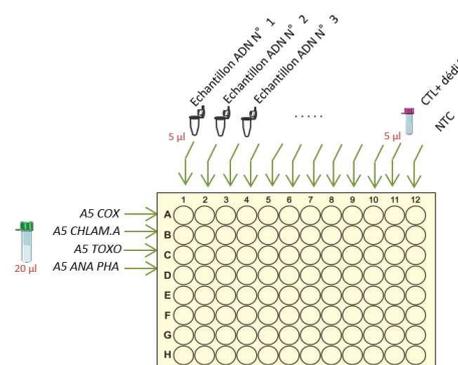
DNA Program	
2 min. +50°C	
10 min. +95°C	
15 sec. +95°C*	45 cycles
1 min. +60°C**	

\*Mettre 30 secondes à +95°C pour les thermocycleurs Mx3005 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. Les solutions A5 contiennent une référence passive ROX pour les appareils ABI. Contacter votre représentant commercial ou le service client pour tout autre modèle de thermocycleur.



## LECTURE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

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

### 1. VALIDATION DE L'ESSAI

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus.

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour les CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

### Méthode qualitative et relative

Témoin	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
Témoins négatifs d'amplification	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification
COX CTL+	Oui	Oui/non	Amplification de la cible <i>Coxiella burnetii</i>
CHLAM.A. CTL+	Oui	Oui/non	Amplification de la cible <i>Chlamydia abortus</i>
TOXO CTL+	Oui	Oui/non	Amplification de la cible <i>Toxoplasma gondii</i>
ANA PHA CTL+	Oui	Oui/non	Amplification de la cible <i>Anaplasma phagocytophilum</i>

### Méthode quantitative pour *Coxiella burnetii*

Témoin	Dilution	Quantité de <i>C. burnetii</i> /ml	Amplification		Validation de
			FAM	HEX ou équivalent	
COX CTL+					Amplification de la cible <i>Coxiella burnetii</i> et de la droite d'étalonnage
pure	4x10 <sup>6</sup>	Oui	Non		
1/10	4x10 <sup>5</sup>	Oui	Non		
1/100	4x10 <sup>4</sup>	Oui	Non		
1/1000	4x10 <sup>3</sup>	Oui	Non		
1/10000 (LQPCR)	4x10 <sup>2</sup>	Oui	Non		

Pour l'interprétation quantitative des résultats, vérifier l'efficacité de la PCR en utilisant, par exemple, le logiciel utilisé avec le thermocycleur.

La droite d'étalonnage est valide, si :

- Les 5 points de la gamme sont amplifiés. Néanmoins, un point de la gamme pourra être ignoré si ce point n'est pas l'un des 2 extrêmes.
- Le coefficient de corrélation R<sup>2</sup> est supérieur à 0,9.
- L'efficacité est comprise entre 85 et 115%
- La répartition des points est homogène.

Pour faciliter l'expression et l'interprétation des résultats, un fichier informatique peut être fourni (contacter votre représentant commercial ou votre service client).

### 2. INTERPRETATION DES RESULTATS

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/ou HEX ou équivalent.

### Méthode qualitative

A5 d'amplification	Amplification		Statut de l'échantillon <i>Pathogène</i>
	FAM	HEX ou équivalent	
A5 COX	Non	Oui	Non détecté en <i>C. burnetii</i>
	Oui	Oui / Non	Détecté en <i>C. burnetii</i>
	Non	Non	Non déterminé
A5 CHLAM.A	Non	Oui	Non détecté en <i>C. abortus</i>
	Oui	Oui / Non	Détecté en <i>C. abortus</i>
	Non	Non	Non déterminé
A5 TOXO	Non	Oui	Non détecté en <i>T. gondii</i>
	Oui	Oui / Non	Détecté en <i>T. gondii</i>
	Non	Non	Non déterminé
A5 ANA PHA	Non	Oui	Non détecté en <i>A. phagocytophilum</i>
	Oui	Oui / Non	Détecté en <i>A. phagocytophilum</i>
	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).

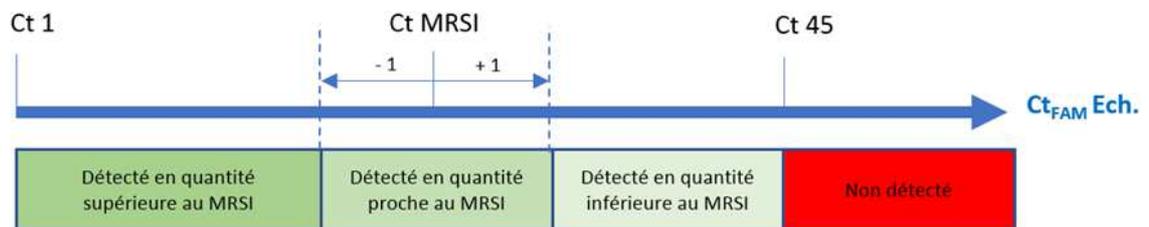
Actions conseillées :

1. Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10<sup>ème</sup> en eau Nuclease-free ;
2. Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

### **Méthode relative pour *C. burnetii***

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

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

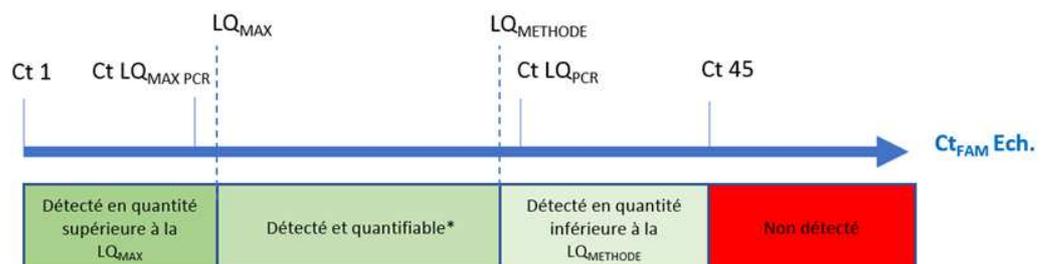


*L'intervalle associé à la valeur seuil est de 1 Ct. Elle est définie par le LNR-FQ (Cf. Note de décision pour les résultats proches du seuil « clinique » du 26 octobre 2017). Dans cet intervalle, on mentionne que le résultat est proche du seuil. Par exemple : "Positif proche du seuil".*

### **Méthode quantitative pour *C. burnetii***

La quantification d'un échantillon positif est possible uniquement dans le domaine de quantification de la méthode utilisée (cf. dossier de validation du kit ADI143-100). L'expression du résultat d'un échantillon est représentée dans le tableau ou schéma suivant :

Exemple	A	B	C	D	E
<b>Amplification FAM</b>	Oui $Ct_{éch.} < LQ_{MAX}$	Oui $LQ_{MAX} < Ct_{éch.} < LQ_{METHODE}$	Oui $Ct_{éch.} > LQ_{METHODE}$	Non	Non
<b>Amplification VIC/HEX</b>	Oui/Non	Oui/Non	Oui/Non	Oui	Non
<b>Expression du résultat</b>	<u>Positif</u> : Déteécté en quantité supérieure à la $LQ_{MAX}$	<u>Positif</u> : Déteécté et quantifiable*	<u>Positif</u> : Déteécté en quantité inférieure à la $LQ_{METHODE}$	<u>Négatif</u> : Non déteécté	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.*

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* / ml
- 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. Il est fixé à 0,6 pour les ADN extraits à partir d'écouvillons avec le kit d'extraction ADIAMAG.

### CONTROLE DE QUALITE

Le kit ADIAVET™ ABORTION est conçu et développé afin de répondre aux exigences de qualité les plus strictes. Le certificat d'analyse est fourni dans le kit ou disponible sur demande.

### ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs non utilisés comme déchets non dangereux.

Éliminer les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Gérer les déchets et les effluents produits selon leur nature et leur dangerosité, assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

## TABLE 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
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière

## HISTORIQUE DE REVISION

## Catégories de type de modification :

N/A	Non Applicable (première version)
Correction	Correction d'anomalies présentes dans la documentation
Modification technique	Ajout, révision et/ou retrait d'informations relatives au produit
Administratif	Modifications d'ordre non technique perceptibles par l'utilisateur

**Remarque :** Les modifications mineures de typographie, de grammaire et de mise en page n'apparaissent pas dans l'historique des révisions.

Date de version	Référence du document	Type de modification	Résumé de la modification
2021/06	NF661-01	N/A	Première publication

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



  
**S.A.S. ADIAGENE**  
 9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat  
 22440 Ploufragan - France

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