

Adia^X Vet

Notice d'utilisation
ADI143-COXI_NO_(FR)_V01
01/2023

COXIELLA REAL TIME

Référence : ADI143-100

Test pour la détection et quantification de *Coxiella burnetii* 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
Ecouvillon (placentaire, vaginal...)	✓	3
Tissu (placenta, tissus fœtaux...)	✓	✗
Fèces	✓	✗
Liquide fœtal	✓	✗
Lait	✓	Tank

* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer). Le nombre est strictement de 3 écouvillons dans le cas du mélange pour le diagnostic d'avortements (recommandations nationales françaises : encadré §H.2.b).

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI143-100 100 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
COX CTL+	Contrôle positif <i>Coxiella burnetii</i>	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	Contrôle exogène non cible d'amplification pour fèces et matrices acellulaires	2 x 300 µL à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
01/2020	NF143-13	Ancienne version
01/2023	V01	Passage au format simplifié

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

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.

L'Observatoire et suivi des causes d'avortements chez les ruminants (Oscar) est un dispositif en France qui vise à colliger et valoriser les résultats du diagnostic différentiel des avortements (DDA) chez les ruminants. Sa finalité est d'améliorer la connaissance des causes infectieuses des avortements, afin d'adapter les mesures de diagnostic, de prévention, et de lutte.

Le test PCR en temps-réel ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME est validé pour permettre les analyses requises dans le cadre de la surveillance syndromique de la fièvre Q.

B. Principe du test

Le test ADIAVET™ COXIELLA REAL TIME repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques de *C. burnetii* (gène IS1111). Il détecte simultanément en monoculture :

- *C. burnetii* (sonde marquée en FAM)
- 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 en HEX ou équivalent).
ou
EPC-Ext : un contrôle exogène pour l'extraction et l'amplification ajouté aux échantillons de fèces ou matrices acellulaires.

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.

C. Performances 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* / 5 µL PCR. La limite de quantification de la PCR est de 2 *Coxiella burnetii* / 5 µL PCR. L'exactitude de la PCR est de ±0,25 log₁₀.

Validation par le LNR-Fièvre Q

Le kit est validé pour le diagnostic d'avortement des ovins, caprins et bovins à partir de mucus vaginal, mucus endocervical, cotylédon placentaire prélevé sur écouvillon. Les méthodes d'extraction validées sont décrites dans le dossier de validation du kit.

D. Conditions de stockage

A réception, le kit doit être stocké à <-15 °C jusqu'à la date de péremption du kit.

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

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

E. 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
- PBS 1X pH 7,4
- Kit d'extraction des acides nucléiques

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

- **LDpccr Positive Control – COX (Réf. : ADC14LD)**
Confirmation des performances – LDpccr du kit.

F. 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 mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- 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).

G. Mode opératoire

1. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext doit être ajouté dans les échantillons de fèces ou matrices acellulaires.

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 décongélation.

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

2. Kits d'extractions

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

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.

Les protocoles d'extraction validés sont décrits dans le dossier de validation du kit. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8°C pendant quelques heures avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °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 définies 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
COX CTL+ (Dilution pure à 1/10000)	Amplification de la cible et gamme étalonnage	5 µL CTL+ dans un puits pour chaque point de gamme 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	Etapas d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction
Matériel de référence au seuil d'interprétation (MRSI) pour PCR relative	Etapas d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif dosé* à partir du MRE bactéries du LNR-FQ, ANSES Sophia-Antipolis) par série d'extraction

* dosé à 10^4 C. burnetii/mL si la série d'extraction contient des écouvillons en analyse individuelle et à 10^3 C. burnetii/mL si elle contient des écouvillons en analyse en mélange, selon les recommandations du LNR-FQ.

4. Préparation du contrôle 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** 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 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.

Dans le cas d'un test quantitatif, réaliser, extemporanément, une gamme étalon en eau Nucléase-free :

Dilution	Concentration du COX CTL+ (EG/mL)
Pure	4×10^6
1/10	4×10^5
1/100	4×10^4
1/1000	4×10^3
1/10000 (=LQ _{PCR})	4×10^2

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

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

Dans le cas d'un test relatif, utiliser **5 µL** de la dilution 1/10000 dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

5. 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 les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

Étape 1 : Répartir **20 µL** de réactif d'amplification A5 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, pour les Mx3000 et 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 Prism.

Contactez votre représentant commercial ou le service client support.pcr@bio.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	Non	Absence de contamination pour l'amplification
COX CTL+ (1/1000)	Oui	Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Etapas d'extraction et d'amplification

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/ou HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	<i>C. burnetii</i>
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui	Détecté
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 1/10^{ème} 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. 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	Non	Absence de contamination pour l'amplification
COX CTL+ (pur à 1/10000)	Oui	Non	Amplification de la cible et gamme étalonnage
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Etapes d'extraction et d'amplification

b. Gamme d'étalonnage

Dilution COX CTL+	Concentration (EG/mL)	Amplification FAM	Validation de
Pure	4x10 ⁶	Oui	Amplification de la cible <i>C. burnetii</i> et de la droite d'étalonnage
1/10	4x10 ⁵	Oui	
1/100	4x10 ⁴	Oui	
1/1000	4x10 ³	Oui	
1/10000	4x10 ²	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 ($Eff\% = \left(10^{\frac{y-b}{a}} - 1\right) \times 100$).

La droite d'étalonnage est valide, si :

- Les 5 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 R² est supérieur à 0,9
- L'efficacité est comprise entre 75 et 125%
- La répartition des points est homogène

c. 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		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	<i>C. burnetii</i>
Non	Oui	Non détecté
Signal < LQ _{METHODE}	Oui/Non	Détecté Acide nucléique détecté en quantité inférieure à la LQ _{METHODE}
LQ _{METHODE} < signal < LQ _{max}	Oui/Non	Détecté Acide nucléique quantifiable
Signal > LQ _{max}	Oui/Non	Détecté Acide nucléique détecté en quantité supérieure à la LQ _{max}
Non	Non	Non déterminé

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 Genome/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.

Exemple de facteur multiplicateur après utilisation du kit d'extraction ADIAMAG selon la notice NFKF :

Matrice	Facteur multiplicateur (F)	Unité
Echantillon liquide (écouvillon vaginal, placentaire et lait)	0,6	<i>C. burnetii</i> / mL
Fèces	3	<i>C. burnetii</i> / g
Tissu	3	<i>C. burnetii</i> / g

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 10⁴ *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 10³ *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*.

« **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 en double avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10^{ème} dans du tampon d'élution du kit d'extraction ;

Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

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

3. Validation et interprétation des résultats relatifs

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	Non	Absence de contamination pour l'amplification
COX CTL+ (1/10000)	Oui	Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Non	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui/Non	Etapes d'extraction et d'amplification
Matériel de référence au seuil d'interprétation (MRSI)*	Oui	Oui/Non	Etapes d'extraction et d'amplification

* dosé à 10^4 C. burnetii/mL en analyse individuelle et à 10^3 C. burnetii/mL en analyse en mélange.

b. Interprétation des résultats par rapport au MRSI

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 C. burnetii
FAM	HEX ou équivalent	
Non	Oui	Non détecté
Oui $Ct_{éch} < Ct_{MRSI} (-1Ct)$	Oui/Non	Détecté en quantité supérieure au MRSI.
Oui $Ct_{éch} = Ct_{MRSI} (+/-1Ct)$	Oui/non	Détecté en quantité proche du MRSI
Oui $Ct_{éch} > Ct_{MRSI} (+1Ct)$	Oui/non	Détecté en quantité inférieure au MRSI
Non	Non	Non déterminé

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".

« **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 en double avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10^{ème} dans du tampon d'éluion du kit d'extraction ; Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

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

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
- 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

Table des symboles

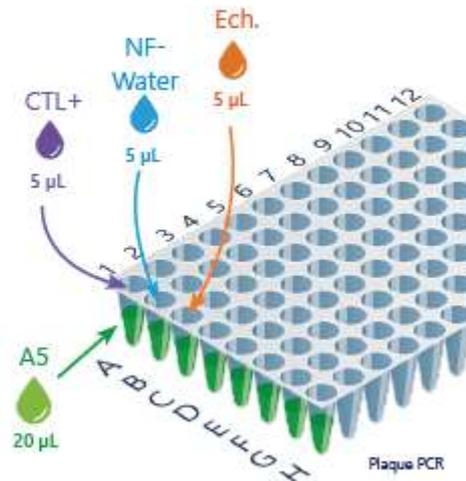
Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de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

1 | Extraire les acides nucléiques avec

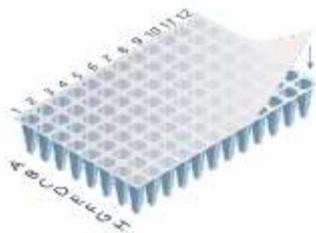


2 | Répartir 20 µL de réactif d'amplification A5

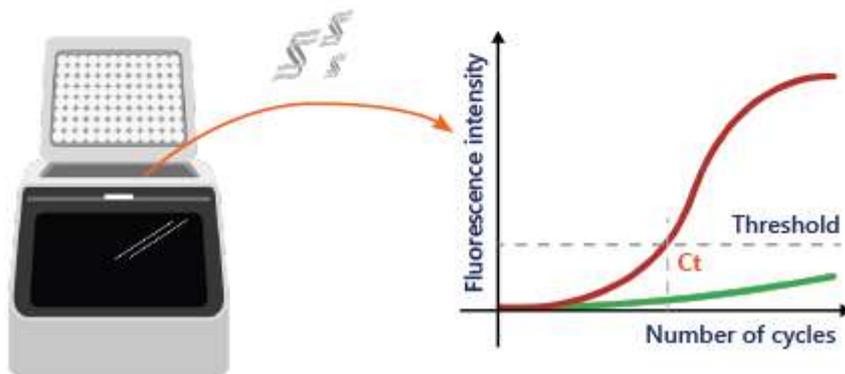
3 | Distribuer 5 µL d'acides nucléiques, CTL+ et NF-Water



4 | Sceller les puits



5 | Démarrer l'analyse PCR



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