



Notice d'utilisation
ADC04SQ01_PTUB_NO_(FR)_V03
03/2024

Adia^X Control

Quantified Extraction Positive Control Paratb Faeces

Référence : ADC04SQ01

Fèces positif quantifié de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Usage *in vitro* et strictement vétérinaire



Composition du kit

Matériel fourni		ADC04SQ01
EPCQ Paratb Faeces	Fèces positif quantifié en <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1 flacon lyophilisé (A reconstituer)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 2000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Kit(s) PCR associé(s)

Kits associé(s)	Référence(s)
ADIAVET™ PARATB REAL TIME	ADI045-100
ADIALYO™ PARATB	ADL04Y1-100

Historique de révision

Date	Version	Modifications
02/2023	V01	Première version
11/2023	V02	Changement de la quantité de dopage de l'EPCQ de 50 µL à 200 µL
03/2024	V03	Ajout du kit associé ADIALYO™ PARATB

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

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*, ou bacille de Johne, colonise la région jéjuno-iléale. Le niveau de contamination des matières fécales évolue en fonction du stade de la maladie, de quelques bactéries par gramme de fèces en début d'expression 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 ; des contaminations par le colostrum, le lait et le sperme sont alors possibles.

La quantification du niveau de contamination trouve un intérêt dans le but de classer les animaux, et ainsi d'isoler les animaux les plus excréteurs. Les kits PCR associés permettent de détecter et de semi-quantifier les mycobactéries dans les fèces par PCR relative à l'aide de l'EPCQ Paratb Faeces quantifié à 10 000 équivalents génome/g de fèces (Kralik *et al.*, 2014 ; Navarro Gonzalez *et al.*, 2019).

B. Principe du test

Le témoin EPCQ Paratb Faeces est quantifié à 10 000 EG/g de fèces après remise en suspension.

Ce témoin positif est inclus dans chaque série d'analyse et permet de semi-quantifier, par PCR relative, la cible *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* dans les échantillons de fèces, avec les kits PCR Bio-X Diagnostics associé(s).

L'EPCQ Paratb Faeces est aussi un matériel de référence fournisseur permettant de confirmer les performances de la méthode.

C. Conditions de stockage

A réception, stocker le kit à +2/8 °C.

Les réactifs reconstitués doivent être aliquotés et stockés à une température inférieure à -15 °C. Ne pas décongeler plus de 3 fois.

D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis dans le kit

- 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.
- Matière fécale négative en PARATB.
- Kit d'extraction des acides nucléiques ADIAMAG (Bio-X Diagnostics réf. 200 tests : réf. NADI003 ; 800 tests : réf. NADI003-XL).
- 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. ADPBIA-4x96).
 - Pour le vibrobroyeur à billes de type Fast Prep ou Ribolyser
 - Lysing Matrix B (MP biomedical, 100 tubes, réf. 116911100).
- Kit(s) PCR associé(s).

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 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).

F. Reconstitution et utilisation de l'EPCQ Paratb Faeces

1. Reconstitution

- Ajouter **2 mL** de « NF-Water » dans le flacon EPCQ Paratb Faeces.
- Homogénéiser le flacon à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes.
- 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.
- L'EPCQ reconstitué est utilisé pour doper une suspension de fèces négative préparée à l'aide du dispositif ADIAPREP.

G. Confirmation des performances – Adoption de méthode - Fidélité au seuil d'interprétation

Préalablement à la mise en place « en routine » d'une méthode de diagnostic moléculaire dûment caractérisée et validée, le laboratoire doit démontrer sa capacité à mettre en œuvre l'essai concerné en vérifiant qu'il obtienne les performances annoncées par le fabricant. Il s'agit de la confirmation des performances ou adoption de méthode (Cf. norme AFNOR U47-600-2).

	PCR qualitative	PCR quantitative	PCR relative
LD _{MÉTHODE}	Oui	Oui	Oui
LQ _{MÉTHODE}	Non	Oui	Oui
Fidélité	Non	Oui	Oui

Bio-X Diagnostics propose, sur demande auprès du service client, un fichier Excel aidant à l'adoption de la PCR et des méthodes.

1. Plans d'expérience

Ci-dessous le plan d'expérience pour chaque méthode. Il est recommandé de réaliser au moins un témoin négatif d'extraction par séance afin de vérifier l'absence de contamination.

a. Plan d'expérience pour la vérification de la LD_{MÉTHODE} et de la LQ_{MÉTHODE} :

Nombre de séances	Nombre d'opérateur(s)	Nombre de répétitions
2	1	2

La gamme de quantification doit être amplifiée en parallèle des extraits de LQ_{MÉTHODE}.

b. Plan d'expérience pour la vérification de la fidélité de la méthode PCR relative

Nombre de séances	Nombre d'opérateur(s)	Nombre de répétitions
2	1	6

c. Méthodes validées à adopter

Les méthodes suivantes ont été validées par Bio-X Diagnostics (Cf. dossier de validation des kits associés). L'EPCQ Paratb Faeces permet de réaliser l'ensemble des adoptions.

Ci-dessous le volume d'EPCQ Paratb Faeces à ajouter selon la méthode et les performances à adopter :

	Méthodes	5xLD	5xLQ	Fidélité
1	ADIAFILTER+ADIAMAG+PCR ADIAVET PARATB REAL TIME	12,4 µL	62 µL	200 µL
2	ADIAPREP+ADIAMAG+PCR ADIAVET PARATB REAL TIME	62 µL	62 µL	200 µL
3	ADIAPREP+ADIAMAG+PCR ADIALYO PARATB	62 µL	62 µL	200 µL
4	ADIAPREP+ADIAPURE Lysis Flex+PCR ADIALYO PARATB	62 µL	125 µL	200 µL

2. Extraction avec la méthode 1

- Peser 4,5 g de fèces. Diluer la quantité d'échantillon fécal avec 30 mL d'eau déminéralisée stérile.
- Ajouter l'EPCQ ParaTB Faeces selon le type d'adoption (Cf. tableau G.1.c).
- Homogénéiser au moins 15 secondes. Laisser sédimenter 10 à 20 minutes.
- Déposer 10 mL de surnageant sur l'ADIAFILTER (Réf. ADIFIL100). Centrifuger 5 minutes à 3 000 g. Eliminer le filtre et le surnageant.
- Ajouter 500 µL d'eau déminéralisée stérile sur le culot et 300 mg de billes de broyage. Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 secondes sur Fast Prep/Ribolyser.
- Centrifuger 5 minutes à 15 000 g.
- Extraire 100 µL de surnageant à l'aide du kit d'extraction ADIAMAG selon la notice du kit.

3. Extraction avec les méthodes 2 et 3

- Prélever 1 cuillère de matière fécale négative à l'aide du dispositif ADIAPREP (réf. ADPREP-200).
- Araser la cuillère et la ré-introduire dans le dispositif.
- Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Ajouter l'EPCQ ParaTB Faeces selon le type d'adoption (Cf. tableau G.1.c).
- Transférer 1 mL dans un microtube, une barrette ou une plaque 96 puits.
- Centrifuger 5 minutes 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 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 secondes sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 3 000 g.
- Extraire 100 µL de surnageant à l'aide du kit d'extraction ADIAMAG selon la notice du kit.

4. Extraction avec la méthode 4

- Prélever 1 cuillère de matière fécale négative à l'aide du dispositif ADIAPREP (réf. ADPREP-200).
- Araser la cuillère et la ré-introduire dans le dispositif.
- Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Ajouter l'EPCQ ParaTB Faeces selon le type d'adoption (Cf. tableau G.1.c).
- Transférer 1 mL dans un microtube, une barrette ou une plaque 96 puits.
- Centrifuger 5 minutes 3 000 g et éliminer le surnageant.
- Ajouter au culot 300 mg de billes de broyage et 500 µL du tampon LF1 du kit ADIAPURE Lysis Flex.
- Broyer 5 minutes 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 secondes sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 3 000 g.
- Extraire 50 µL de surnageant à l'aide du kit d'extraction ADIAPURE Lysis Flex selon la notice du kit.

5. Amplification

Tous les acides nucléiques extraits sont amplifiés avec le(s) kit(s) PCR Bio-X Diagnostics associé(s) et selon leur(s) notice(s) d'utilisation.

6. Validation de l'adoption

a) Confirmation de la LD_{METHODE}

Les 4 résultats obtenus doivent être positifs pour la cible recherchée.

b) Confirmation de la LQ_{METHODE}

Les 4 résultats obtenus doivent être positifs et quantifiés pour la cible recherchée. L'efficacité de la gamme de quantification doit être comprise entre 75 et 125 % et le biais de quantification doit être inférieur à 1 log (EG/g).

c) Fidélité au seuil d'interprétation (détermination de l'incertitude élargie (Ur)) :

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour l'EPCQ Paratb Faeces sont indiquées sur le certificat d'analyse.

Le laboratoire doit déterminer pour chaque séance la valeur moyenne du Ct de l'EPCQ Paratb Faeces et estimer, sur l'ensemble des séances en condition de fidélité intermédiaire, son écart-type de répétabilité. L'incertitude élargie de mesure du Ct au seuil d'interprétation (Ur) du laboratoire est définie comme 2 fois l'écart-type de répétabilité en fidélité intermédiaire (Cf. norme U47-600-2 §7.3.4 et son annexe D).

Le laboratoire doit vérifier la valeur de l'incertitude élargie (Ur) et doit respecter la limite maximale d'acceptabilité de l'incertitude de 3 Ct définie par le fabricant.

H. Analyse de routine – PCR relative

Lors d'analyse par PCR relative, l'EPCQ Paratb Faeces est à intégrer à chaque série d'analyse.

1. Extraction

Pour toutes les méthodes, une suspension de fèces exempte de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* doit être dopée avec **200 µL de l'EPCQ Paratb Faeces**. Ce niveau de contamination correspond à 10 000 équivalents génome/g de fèces. Préparer et extraire cette suspension dopée selon la méthode choisie (Cf. protocole d'extraction utilisé lors de l'adoption de la méthode §G.). Des aliquots de la suspension dopée peuvent être conservés à -20 °C.

2. Amplification

Les acides nucléiques extraits sont amplifiés avec le(s) kit(s) PCR Bio-X Diagnostics associé(s) et selon leur(s) notice(s) d'utilisation.

3. Validation et interprétations des résultats

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.

Contrôles	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
EPCQ Paratb Faeces	Oui Ct_{EPCQ} = Ct_{moy} +/- Ur	Oui	Etapes d'extraction et d'amplification
Témoin réactif (NTC)	Non	Non	Absence de contamination pour l'amplification
PARATB CTL+	Oui	Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Oui	Absence de contamination pour l'extraction

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

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour l'EPCQ Paratb Faeces sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit. Les limites d'acceptation sont de +/-Ur en fonction de la moyenne de Ct de l'EPCQ Paratb Faeces calculée par le laboratoire lors de l'adoption de la fidélité au seuil d'interprétation.

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	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
Non	Oui	Non détecté
Oui $Ct_{éch} < Ct_{EPCQ+Ur}$	Oui/Non	Détecté en quantité supérieure à l'EPCQ Paratb Faeces.
Oui $Ct_{éch} = Ct_{EPCQ} +/- Ur$	Oui/Non	Détecté en quantité proche de l'EPCQ Paratb Faeces
Oui $Ct_{éch} > Ct_{EPCQ-Ur}$	Oui/Non	Détecté en quantité inférieure à l'EPCQ Paratb Faeces.
Non	Non	Non déterminé

Ur = Incertitude élargie calculé par le laboratoire lors de l'adoption de méthode correspondant à 2 fois l'écart-type calculé.

« **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

Déficiência 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.

Références

- Collins, J. D. *et al.*, Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces, Vet. Microbiol. (1993).
- Kralik P., *et al.*; Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. Vet J (2014).
- 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.
- Navarro-Gonzalez N. *et al.*, Longitudinal study of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal shedding patterns and concurrent serological patterns in naturally infected dairy cattle. J Dairy Sci (2019).

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