

Mix prêt à l'emploi : Simplicité, Rapidité ! ...

PCR License

This product is offered under a license for the manufacture and the sale of veterinary PCR products from ROCHE. The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification and detection of nucleic acid sequences for providing veterinary in vitro diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

Kit TAQVET

Coxiella burnetii

LSI PCR TaqMan® Quantitative

Réf : FQP

Pour détection de *Coxiella burnetii* dans les échantillons cellulaires :

Placenta ou écouvillon placentaire

Tissu ou Liquide Foetal

Lait

Mucus Vaginal

Ecouvillon vaginal et cervical

par utilisation de sondes TaqMan®
en PCR temps réel sur thermocycleurs plaques

**Attention
modifications du kit**

Coffret unique à -20°C à réception

**Détection de *Coxiella b.* à partir
d'échantillons cellulaires**



LSI

Laboratoire Service International

6 Allée des écureuils
Parc d'activité du Bois Dieu
69380 LISSIEU – France

Tel : + (33) 04 72 54 82 82

Fax : + (33) 04 72 54 82 83

Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 17h.

Office open from Monday until Friday : 9 am to 5 pm.

Direction / Management

Eric SELLAL - eric@lsivet.com

Patricia GIROUD – Patricia@lsivet.com

Marketing & commercial / Marketing & commercial Informations commerciales / Commercial Information

Lise GREWIS – lise@lsivet.com

Commandes / Orders

Livraisons / *Delivery*

Richard GIROUD – Richard@lsivet.com

Informations PCR / PCR Information

Supports Techniques PCR / *PCR Technical Information*

Sandrine Moine – sandrine@lsivet.com

Mylène Salus – mylene@lsivet.com

Julie Charrot – jcharrot@lsivet.com

Stéphane Daly – sdaly@lsivet.com

Stéphanie Colin – stephanie@lsivet.com

Informations ELISA / ELISA Information

Supports Techniques ELISA / *ELISA Technical Information*

Julie Meunier – julieM@lsivet.com

Informations Légales / Legal Information

LSI – Laboratoire Service International

SAS au capital de 120 000,00 Euros

VAT : FR67380105544

RCS : 38010554400031 APE : 244D

Kit TAQVET[®] *Coxiella burnetii*

LSI PCR TaqMan[®] Quantitative

Réf : FQP

Sommaire

	Pages
I. Introduction	4
II. Réactifs fournis dans le Kit	5
III. Matériel et réactifs non fournis et conseillés	6
IV. Les échantillons	6
V. 1/ Extraction de l'ADN en colonne	8
2/ Extraction de l'ADN en plaque	10
VI. Reconstitution des Mix réactionnels	11
VII. Protocole d'amplification	11
VIII. Interprétation des résultats	13

Kit TAQVET[®] *Coxiella burnetii*

LSI PCR TaqMan[®] Quantitative

Pour détection de *Coxiella burnetii* dans les laits, les écouvillons vaginaux ou cervicaux, les placentas, les tissus ou liquides fœtaux et les mucus vaginaux par utilisation de sondes TaqMan[®] en PCR temps réel.

Réf : FQP

I – Introduction

1/ Fièvre Q :

La fièvre Q est une maladie infectieuse animale transmissible à l'homme. L'agent responsable de cette zoonose est une bactérie : *Coxiella burnetii*. Les caractéristiques bactériologiques sont les suivantes : bacille gram –, polymorphe, intracellulaire, 0.2µm à 0.4µm, résistante à des conditions extrêmes.

La fièvre Q est transmise par le bétail (bovins, ovins, caprins). La fièvre Q peut-être responsable chez l'animal :

- d'avortement, de métrites, de pathologie néo-natale.
- d'une excrétion chronique de bactéries.

Selon Euzéby, J.P. : Dictionnaire Bactériologie Vétérinaire (mise à jour du 140101). <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html> :

« la manipulation de prélèvements renfermant des souches de *Coxiella burnetii* fait courir un risque au manipulateur et plusieurs cas de fièvre Q ont été observés chez des techniciens de laboratoire. *Coxiella burnetii* est classée parmi les germes de groupe 3 (cf fichier "La classification des bactéries en fonction du risque d'infection pour l'homme") et elle ne peut être manipulée que dans un laboratoire P3. »

LSI recommande pour les laboratoires qui ne sont pas équipés de P3 et qui souhaitent réaliser des analyses *Coxiella burnetii* d'inactiver les échantillons avant traitement.

2/ Kit TAQVET *Coxiella burnetii* :

Le Kit TAQVET *Coxiella burnetii* peut être utilisé dans deux types d'applications :

- Une application qualitative (Positif / Négatif)
- Une application quantitative (concentration bactéries/unité de volume)

Quelques définitions

Définition de la quantification absolue

Détermination d'une quantité (nombre de copies) à l'aide d'une courbe standard. Le standard à concentration connue est dilué en série et déposé dans chaque PCR. L'efficacité de la PCR et l'interférence d'éventuels inhibiteurs ne sont pas prises en compte.

Définition de la quantification relative

Détermination d'un ratio d'expression d'un gène cible par rapport à un gène de référence.

Cette quantification nécessite de connaître les efficacités des PCR respectives (gène cible et gène de référence). L'efficacité de la PCR est traduite par la pente d'une droite de régression obtenue par la gamme de dilution d'un standard pour le gène cible et pour le gène de référence.

Le système de Quantification LSI

Le principe de quantification utilisé est celui d'une quantification absolue normalisée par l'expression d'un gène de référence. On détermine le ratio d'expression du gène de *Coxiella burnetii* (gène cible) par rapport au gène de GAPDH (gène de référence).

Les efficacités de *Coxiella burnetii* et celle de l'IPC (GAPDH) obtenues par les droites de régression permettent de calculer le

Ratio d'Expression Relative par la formule de PFAFFL :

$$\text{RER} = \frac{E_{\text{FQ}}^{\wedge} (\text{Ct}_{\text{FQ EPC}} - \text{Ct}_{\text{FQ éch}})}{E_{\text{IPC}}^{\wedge} (\text{Ct}_{\text{IPC EPC}} - \text{Ct}_{\text{IPC éch}})}$$

Ce ratio est traduit en concentration (nombre de bactéries/unité de volume) via le standard INRA à concentration connue.

Chaque échantillon (ADN obtenu après extraction) est analysé en monocupule :

- La détection spécifique simultanée de l'ADN bactérien et la détection de l'IPC (**I**nternal **P**ositive **C**ontrol) est réalisée en une seule cupule. La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons.

L'IPC est un Internal Positive Control endogène aux placentas, écouvillons, fœtus, liquides fœtaux et laits.

L'EPC est un antigène purifié inactivé. L'EPC ne contient pas la séquence de l'IPC.

Le Kit TAQVET *Coxiella burnetii* contient :

- 1 **mix réactionnel prêt à l'emploi** contenant:
 - ✚ 1 set de Nucléotides FQ :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde FQ – Sonde TaqMan® marquée **FAM – TAMRA**.
 - ✚ 1 set de Nucléotides IPC :
 - 1 Forward Primer.
 - 1 Reverse Primer.
 - 1 Sonde IPC – Sonde TaqMan® marquée **VIC - TAMRA**.
 - ✚ 1 **Master Mix** pour PCR TaqMan® ADN.
- 1 **EPC FQ** (External Positive Control).
- 1 **Diluant EPC** : lait servant de diluant à l'EPC.

L'extraction et la purification de l'ADN bactérien peuvent être réalisées sur colonnes (Qiagen ou Macherey Nagel).

L'extraction et la purification de l'ADN bactérien peuvent être réalisées sur plaques (Qiagen ou Macherey Nagel).

- Le Kit TAQVET *Coxiella burnetii* a été validé et doit être utilisé avec un thermocycleur ABIPRISM® Stratagène, SLAN (LSI) . Le Kit TAQVET *Coxiella burnetii* est utilisable sur d'autres appareils de PCR en temps réel à condition que l'appareil soit validé par LSI. Merci de nous contacter pour connaître la liste des appareils validés.
- Les résultats sont interprétés en fonction des Ct (Threshold Cycle) obtenus pour chaque échantillon :
 - **Si Ct échantillon < 40**, l'échantillon est positif.
 - **Si Ct échantillon > 40**, l'échantillon est négatif.

II - Réactifs fournis dans le Kit

Le Kit TAQVET *Coxiella burnetii* se présente sous la forme d'un UNIQUE coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 100 tests en monocupule. Suite à la 1^{ère} utilisation du kit, placer le tube « Mix FQ reconstitué » à +4°C. Un kit non utilisé peut-être conservé dans sa globalité (EPC, diluant EPC et Mix FQ reconstitué) à -20°C.

Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Code Couleur	Conservation	
			À réception	Après la 1 ^{ère} utilisation
Mix FQ reconstitué	2 Tube de 2 mL	Vert	-20°C	+4°C
EPC FQ	1 Tube de 0,5 mL	Bleu	-20°C	-20°C
Diluant EPC	1 Tube de 2 mL	Violet	-20°C	-20°C

Mix reconstitué FQ : Mix réactionnel prêt à l'emploi pour PCR TaqMan® *Coxiella burnetii*.

EPC FQ : External Positive Control Fièvre Q : Souche INRA de *Coxiella burnetii* quantifiée à 10⁵ bactéries/ml.

Diluant EPC : Lait servant à la préparation de l'EPC en vue de l'extraction.

Attention : Le Contrôle Négatif utilisé dans la réaction n'est pas fourni dans le Kit. LSI recommande d'utiliser de l'eau DNase RNase Free. **2 types de Contrôle Négatif peuvent être utilisés** :

1/ NCS : Négative Control Sample : Eau DNase RNase Free extraite comme un échantillon. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de l'amplification et de l'extraction.

Il est conseillé de doubler au minimum ce contrôle lors de chaque extraction : un NCS en début d'extraction et un autre en fin d'extraction.

2/ NC : Negative Control : 25 µl de « Mix FQ » dans la plaque d'amplification. Un résultat négatif indiquera l'absence de contamination lors de la préparation du Mix.

III - Matériel et réactifs non fournis et conseillés

Pour l'extraction d'ADN :

- o Une étuve 70°C.
- o Un vortex ou équivalent.
- o Micropipette de précision (gamme de 0,5 ou 1µL à 1000µL) avec embouts RNase free avec barrière filtrante.
- o Microtubes RNase et DNase free de 1,5mL (type Eppendorf ou équivalent).
- o Tubes collecteurs de 2mL.
- o Ethanol 100%.
- o Eau DNase et RNase free qui servira de **Contrôle Négatif**.

- Pour l'extraction sur colonnes (Kit QIAamp DNA mini kit de Qiagen **OU kit Nucleospin Tissue de Macherey Nagel**) la centrifugeuse doit être de type Eppendorf (vitesse 8 000 à 15 000 g).

- Pour l'extraction sur Plaque 96 (Kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot kit **OU kit Nucleospin 96 Tissue de Macherey Nagel**) la centrifugeuse doit être de type sigma 4K15 + rotor pour plaque (vitesse 6 000 g).

Pour l'amplification :

- Un thermocycleur avec son consommable : Optical 96-well Reaction Plates et Adhesive Covers.

Pour les manipulations :

- Gants latex non talqués.

IV – Les échantillons

Numéroter ou identifier les tubes ou les microtubes qui contiendront les échantillons ou les extraits.

Les prélèvements : ils seront tous de types « cellulaires » (= contenant de l'IPC endogène, intrinsèque aux cellules)

Type échantillon	Matériel à prélever
Placenta ou tissu foetal	20 mg de placenta ou tissu foetal
Organe	20 mg de foie, poumon, rate, reins,...
Liquide foetal	200 µL de liquide foetal
Lait	200 µL de lait bromopolé
Mucus Vaginal	200 µL de mucus
Écouvillon vaginal ou cervical	200 µL d'écouvillon élué*

**utiliser un écouvillon cotonné stérile avec un étui de transport.*

1/ Placenta ou tissu foetal :

Le placenta ou le tissu foetal peut être utilisé frais, conservé à +4°C (8 jours maximum) ou congelé à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

• Préparation du placenta :

1. Disséquer finement le morceau de placenta dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 mg** maximum du placenta préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/-1 mg).

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de 20 mg au maximum de placenta - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

- Il est également possible de broyer le placenta ou le tissu foetal avec un broyeur de type « Mixer-Mill » ou « TissueLyser » avec des billes inox de 3 mm.

- Enfin, il est possible d'écouvillonner le placenta. Pour cela, prendre un écouvillon sec et stérile, cotonné sans milieu de transport et passer l'écouvillon plusieurs fois sur le placenta. Suivre ensuite la procédure « § 5 / écouvillon placentaire ».

2/ Organe :

L'organe peut être utilisé frais, conservé à +4°C (8 jours maximum) ou congelé à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

• Préparation de l'organe:

1. Disséquer finement le morceau d'organe dans une boîte de Pétri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 mg** maximum d'organe préalablement disséqué à l'aide d'une balance de précision (+/-1 mg).

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de 20 mg d'organe - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

Il est également possible de broyer les organes avec un broyeur à billes de type « Mixer-Mill » ou « TissueLyser ».

3/ Liquide foetal ou mucus vaginal :

Le liquide foetal (ou le mucus vaginal) peut être utilisé frais, conservé à +4°C (8 jours maximum) ou congelé à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **200 µL** de liquide foetal (ou de mucus vaginal) - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

4/ Lait :

Le lait peut être utilisé frais, conservé à +4°C (8 jours maximum) avec conservateur (bromopol) ou congelé à -20°C (1 an maximum) ou à -70°C (plusieurs années).

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **200 µl** de lait - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

5/ Ecouvillon placentaire, vaginal et cervical :

L'écouvillon peut être utilisé frais conservé à +4°C (24H maximum) ou congelé à -20°C (1 mois maximum) ou plusieurs mois à 70°C.

1. Ajouter **1 ml** de PBS 1x dans un tube eppendorf.
2. **Eluer** l'extrémité de l'écouvillon dans le PBS
3. Enlever l'écouvillon en l'écrasant sur la paroi
4. Récupérer et stocker le PBS contenant le mucus dans un tube eppendorf 1.5ml.

L'extraction de l'ADN est réalisable directement à partir de **200 µL** de l'éluât - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

V - Extraction de l'ADN**Respecter impérativement les bonnes pratiques de laboratoire.**

Afin de limiter les risques de contamination inter-échantillon, LSI conseille de :

- pulvériser un désinfectant (ex : Mucocit) à la fin de chaque étape de l'extraction sur les gants et la pailleuse
- espacer au maximum les échantillons (notamment des placentas ou des fœtus) lors de l'extraction
- multiplier les contrôles négatifs.

L'extraction d'ADN en colonnes est réalisée avec le kit QIAamp DNA mini kit (Réf Qiagen 51304) OU Nucleospin Tissue de Macherey Nagel (50 ou 250 preps, réf Macherey Nagel : 740952.50 ou 740952.250).

L'extraction d'ADN en plaques est réalisée avec le kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot kit (Qiagen 965842) OU le kit Nucleospin 96 Tissue (2, 4 ou 24 x 96 preps, réf Macherey Nagel : 740741.2, 740741.4 ou 740741.24).

Extraction de l' EPC, NCS et NC :

EPC : Lors de la première utilisation du kit, l'EPC FQ est à diluer au 1/10 dans le « **Diluant EPC** » pour obtenir un « Standard FQ à 10⁴ bactéries/mL ». Ce « standard FQ » est à extraire selon le protocole indiqué ci-dessous.

L'ADN de ce standard est ensuite dilué pour obtenir des ADN à 10³, 10² et 10¹ bactéries/ml.

Le protocole de dilution est indiqué ci-dessous.

Les ADN à 10³, 10² et 10¹ bactéries/ml sont à aliquoter sous un volume de 50 µl et à stocker à -20°C ou -80°C.

NCS : Il est à extraire en même temps que les échantillons.

NC : Distribuer directement 25 µl de « Mix FQ » dans la plaque d'amplification.

Préparation de l'EPC FQ :

Attention : Il est important que le standard FQ 10^4 soit extrait selon le même protocole (colonne ou plaque) que les échantillons terrains à quantifier. Dans le cas où vous utilisez les deux techniques d'extraction, vous devez avoir une gamme d'ADN standard « colonne » et une gamme d'ADN standard « plaque ».

1. Dans un microtube, ajouter **180 µl** de **Diluant EPC** et **20 µl** d'**EPC FQ**. (Obtention d'un Standard FQ à 10^4 bactérie/ml)
2. Extraire selon le protocole ci-dessous « Standard FQ (EPC) ».
3. Une fois l'extraction terminée, diluer l'ADN Standard FQ 10^4 (1) pour obtenir des ADN à 10^3 , 10^2 et 10^1 bactéries/ml.
Faire des dilutions en série au 1/10, 1/100 et 1/1000:
20 µl d'ADN Standard 10^4 (1) dans 180 µl d'eau DNase RNase free => obtention d'un ADN 10^3 (2)
20 µl d'ADN Standard 10^3 (2) dans 180 µl d'eau DNase RNase free. => obtention d'un ADN 10^2 (3)
20 µl d'ADN Standard 10^2 (3) dans 180 µl d'eau DNase RNase free. => obtention d'un ADN 10^1
4. Ces ADN standard ne sont à réaliser que lors de la première utilisation du kit.
Aliqueter les ADN 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 sous 50 µl et les stocker à -20°C ou -80°C pendant 6 mois maximum.

Tableau récapitulatif de préparation de l'EPC FQ :

Nom	Concentration	Dilution	Protocole	Résultat
EPC FQ	10^5 (Souche INRA)	/	/	/
Standard FQ 10^4	10^4	1/10	180 µl Diluant EPC + 20 µl d'EPC FQ à extraire	Obtention d'un ADN Standard FQ 10^4
ADN Standard FQ 10^3	10^3	1/100	20 µl ADN 10^4 + 180 µl d'eau DNase RNase free	Obtention d'un ADN Standard FQ 10^3
ADN Standard FQ 10^2	10^2	1/1 000	20 µl ADN 10^3 + 180 µl d'eau DNase RNase free	Obtention d'un ADN Standard FQ 10^2
ADN Standard FQ 10^1	10^1	1/10 000	20 µl ADN 10^2 + 180 µl d'eau DNase RNase free	Obtention d'un ADN Standard FQ 10^1

V.1 - Extraction de l'ADN en colonne**V.1.1/ Extraction avec le Kit QIAamp DNA Mini kit de Qiagen**

1. Régler une étuve à 70°C :
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Placenta, tissu foetal et autres organes** : dans un tube Eppendorf :
 - Ajouter **180 µl** de **Buffer ATL**
 - Ajouter **20 µl** de **Protéinase K**
 - Peser **20 mg** d'organe finement disséqué

(L'organe peut être broyé à l'aide d'un tissu lyser avec 2 billes inox de 3 mm. Broyer 50 mg d'organe avec 500 µL d'eau RNase et DNase free et les billes 2 x 3 min à 30 Hz. Centrifuger 1 min à 6000 g. Prélever 200 µl du broyat au lieu des 20 mg d'organe)

- Vortexer pendant 1 minute

✚ **Lait - Standard FQ (EPC) - Mucus Vaginal - Eluât d'écouvillon - Liquide foetal - NCS :**

Dans un tube Eppendorf :

- Ajouter **180 µl** de **Buffer ATL**
- Ajouter **20 µl** de **Protéinase K**
- Prélever **200 µl** de **lait** à analyser (ou de **Standard FQ**), **mucus** ou **d'éluât d'écouvillon, liquide foetal**, ou **d'eau** pour le NCS.
- Vortexer pendant 1 minute

3. Incuber à **70°C** 30 min ou **1 nuit à 56°C**
4. Vortexer quelques secondes **puis ajouter 200 µl de Buffer AL** et vortexer **15 secondes**
5. Incuber **10 minutes** à **70°C**

6. Ajouter **200 µL d'éthanol 100%** - vortexer 15 secondes – centrifuger rapidement
7. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci. Centrifuger 1 min à 15 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**
8. Ajouter **500 µl de Buffer AW1**. Centrifuger 1 min à 15 000 g
Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
9. Ajouter **500 µl de Buffer AW2**. Centrifuger 1 min à 15 000 g
Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
10. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 15 000 g (*Séchage de la membrane*)
11. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **200 µl de Buffer AE** pour éluer l'ADN
Laisser incubé 1 min puis centrifuger à 6000 g pendant 1 min
12. Stocker l'échantillon obtenu dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C ou à -80°C.

V.1.2/ Extraction avec le Nucleospin Tissue de Macherey Nagel

1. Régler une étuve à 70°C:
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Placenta, tissu foetal et autres organes** : dans un tube Eppendorf :
 - Ajouter **180 µL de Buffer T1**
 - Ajouter **25 µl de Protéinase K**
 - Peser **20 mg d'organe** finement disséqué

(L'organe peut être broyé à l'aide d'un tissu lyser avec 2 billes inox de 3 mm. Broyer 50 mg d'organe avec 500 µL d'eau RNase et DNase free et les billes 2 x 3 min à 30 Hz. Centrifuger 1 min à 6000 g. Prélever 200 µl du broyat au lieu des 20 mg d'organe)

 - Vortexer pendant 1 minute.
 - ✚ **Lait - Standard FQ (EPC) - Mucus Vaginal - Eluât d'écouvillon - Liquide foetal - NCS** :
 - Dans un tube Eppendorf :
 - Ajouter **180 µl de Buffer T1**
 - Ajouter **25 µl de Protéinase K**
 - Prélever **200 µl de lait** à analyser (ou de **Standard FQ**), **mucus** ou **d'éluât d'écouvillon, liquide foetal**, ou **d'eau** pour le NCS.
 - Vortexer pendant 1 minute.
3. Incuber à **70°C** 30 min ou **1 nuit à 56°C**
4. Vortexer quelques secondes :
Ajouter **200 µl de Buffer B3** et vortexer **15 secondes**
5. Incuber **10 minutes** à **70°C**
6. Ajouter **200 µL d'éthanol 100%** - vortexer 15 secondes – centrifuger rapidement.
7. **Identifier des colonnes** et **transférer le contenu** des tubes Eppendorf dans celles-ci.
Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
8. Ajouter **500 µl de Buffer BW**. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
9. Ajouter **600 µl de Buffer B5**. Centrifuger 1 min à 11 000 g. Jeter le tube collecteur- **conserver la colonne**.
10. Mettre la colonne sur un nouveau tube collecteur et centrifuger 3 min à 11 000 g. (*Séchage de la membrane*)
11. Mettre la colonne sur un tube Eppendorf de 1,5 ml et ajouter **200 µl de Buffer BE** pour éluer l'ADN.
Laisser incubé 1 min puis centrifuger à 6000 g pendant 1 min.
12. Stocker l'échantillon obtenu dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C ou à -80°C.

V.2- Extraction de l'ADN en plaques

V.2.1 Kit QIAamp 96 DNA Swab Biorobot de QIAGEN

Les S-Blocks sont réutilisables après nettoyage et décontamination : Rincer avec de l'eau distillée, contact 1 minute à température ambiante dans une solution à 0,4 M HCl, vider, et rincer à nouveau en eau distillée. Les S-Blocks sont également autoclavables après lavage.

1. Régler une étuve à 70°C
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Pour les placentas, tissus fœtaux et autres organes** : Dans un Block de lyse (S-Block **1**):
 - Ajouter **180 µL de Buffer ATL**
 - Ajouter **20 µl de Protéinase K**
 - Peser **20 mg d'organe** finement disséqué

(L'organe peut être broyé à l'aide d'un tissu lyser avec 2 billes inox de 3 mm. Broyer 50 mg d'organe avec 500 µL d'eau RNase et DNase free et les billes 2 x 3 min à 30 Hz. Centrifuger 1 min à 6000 g. Prélever 200 µl du broyat au lieu des 20 mg d'organe)

 - Agiter par refoulements à la pipette
 - ✚ **Lait - Standard FQ (EPC) - Mucus Vaginal - Eluât d'écouvillon - Liquide fœtal - NCS** :
 Dans un Block de lyse (S-Block **1**) :
 - Ajouter **180 µl de Buffer ATL**
 - Ajouter **20 µl de Protéinase K**
 - Prélever **200 µl de lait** à analyser (ou de **Standard FQ**), **mucus** ou **d'éluât d'écouvillon, liquide fœtal**, ou **d'eau** pour le NCS
 - Agiter par refoulements à la pipette
3. Filmer le Bloc de lyse (S-Block **1**) et **Incuber à 70°C pendant 30 min ou 1 nuit à 56°C**
4. Ajouter **200 µl de Buffer AL** et agiter **15 secondes**
5. Incuber **10 minutes à 70°C**
6. Ajouter **200 µl d'éthanol** à 100%
7. Prendre un plaque QIAamp-96 et placer la sur un nouveau S-Block (S-Block **2**). Transférer les échantillons du S-Block **1** dans la plaque QIAamp-96 en respectant le plan de plaque . Couvrir la plaque QIAamp-96 avec un adhésif. Centrifuger 4min à 6 000g
8. Distribuer **500 µl de Buffer AW1** dans chaque puit de la plaque QIAamp-96. Couvrir la plaque QIAamp-96 avec un adhésif. Centrifuger **4 min à 6 000 g**
9. Prendre un nouveau S-Block (S-Block **3**). Distribuer **500 µl de Buffer AW2** dans chaque puit de la plaque QIAamp 96. Couvrir la plaque QIAamp-96 avec un adhésif. Centrifuger **4 min à 6 000 g**
10. Garder le même S-Block (S-Block **3**). Centrifuger **10 min à 6 000 g (sans adhésif pour sécher les membranes)**
11. Placer la plaque QIAamp-96 sur **une boîte de tubes collecteurs** (Microtubes pour Elution CL)
12. Distribuer **100 µl de Buffer AE** dans chaque puit de la **plaque** QIAamp-96. Incuber 2 min à t°ambiante
13. Centrifuger **3 min à 6000 g (avec adhésif)** – retirer la plaque QIAamp 96– boucher les tubes
14. Stocker l'échantillon obtenu (ADN) dans de la glace pilée (0°C à + 4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C ou à -80°C.

V.2.2 - Kit Nucleospin 96 Tissue de Macherey Nagel

1. Régler une étuve à 70°C
2. Préparation des échantillons :
 - ✚ **Placenta, tissu fœtal et autres organes** : Dans un Square Well Block de lyse (SW**1**):
 - Ajouter **180 µL de Buffer T1**
 - Ajouter **25 µl de Protéinase K**
 - Peser **20 mg d'organe** finement disséqué

(L'organe peut être broyé à l'aide d'un tissu lyser avec 2 billes inox de 3 mm. Broyer 50 mg d'organe avec 500 µL d'eau RNase et DNase free et les billes 2 x 3 min à 30 Hz. Centrifuger 1 min à 6000 g. Prélever 200 µl du broyat au lieu des 20 mg d'organe)

 - Agiter par refoulements à la pipette

✚ Lait - Standard FQ (EPC) - Mucus Vaginal - Eluât d'écouvillon - Liquide foetal - NCS :

Dans un Square Well Block de lyse (SW1):

- Ajouter **180 µl de Buffer T1**
- Ajouter **25 µl de Protéinase K**
- Prélever **200 µl de lait** à analyser (ou de **Standard FQ**), **mucus** ou **d'éluât d'écouvillon**, **liquide foetal**, ou **d'eau** pour le NCS.
- Agiter par refoulements à la pipette

3. Mettre un film adhésif sur le Square Well bloc (SW1) et **incuber 30 min à 70°C** à l'étuve ou **toute la nuit** (16 à 18h) à **56°C** dans un Round Well bloc (RW1) scellé avec bouchons
4. **Ajouter 200 µl d'éthanol à 100%** et agiter par aller – retour à la pipette (environ 5 fois)
5. Mettre la **plaque d'extraction** sur un nouveau Square Well bloc (SW2) et y **transférer le contenu** du SW1 ou RW1. Couvrir avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6000 g**
6. Ajouter dans la plaque d'extraction **600 µl de Buffer BW**. Garder le SW2. Couvrir avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6000 g**
7. Ajouter dans la plaque d'extraction **900 µl de Buffer B5**. Changer le Square Well bloc (SW3). Couvrir avec un adhésif. **Centrifuger 2 min à 6000 g**
8. Vider le SW3 et **centrifuger** 10 min à 6000 g - (*Séchage de la membrane*)
9. Mettre la plaque d'extraction sur les **MN tubes strips** (plaque bleu) et ajouter **100 µl de Buffer BE*** pour éluer l'ADN. Laisser **incuber 3 min** puis **centrifuger 3 min à 6000 g**
10. Stocker l'échantillon obtenu dans de la glace pilée (0°C à +4°C) si l'amplification est réalisée tout de suite ou conserver l'ADN à -20°C ou à -80°C.

* on peut éluer l'ADN dans un tampon coloré : **le Yellow Elution Buffer** (ref : ETAR)

VI - Reconstitution des Mix réactionnels

Le Mix FQ est prêt à l'emploi.

- Vortexer le tube de Mix FQ reconstitué et pipeter 20 µl de « Mix FQ Reconstitué » par échantillon à tester dans un tube eppendorf (réaliser cette étape en pièce de mix pour éviter les contaminations du tube initial de « Mix FQ reconstitué »).
- Distribuer 20 µl de mix par échantillon à tester dans la microplaque PCR.

Exemple :

400 µl de « Mix FQ Reconstitué » dans un tube eppendorf pour 19 échantillons à tester (prévoir 1 échantillon en plus pour le volume mort).



Mix FQ reconstitué



Quantité de Mix
nécessaire à l'analyse



20 µl de Mix / puits PCR

Ne jamais mélanger des réactifs issus de Kits TaqVet® ayant des numéros de lots différents.

VII - Protocole d'amplification

Prendre une microplaque PCR avec un Adhesive Cover et créer le plan de plaque suivant :

- Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 2 « Detectors » :

FQ : Reporter FAM, Quencher : TAMRA.
 IPC : Reporter VIC, Quencher : TAMRA.

- Attribuer à chaque cupule le « Detector » Fièvre Q (FQ) et le « Detector » IPC

- c. **En applications qualitatives**, réaliser le plan de plaque suivant :

	Mix FQ 1	Mix FQ 2	Mix FQ 3	Mix FQ 4	Mix FQ 5	Mix FQ 6	Mix FQ 7	Mix FQ 8	Mix FQ 9	Mix FQ 10	Mix FQ 11	Mix FQ 12
A	Standard FQ 10⁴											
B	NCS											
C	NC											
D												
E												
F												
G												
H												

- d. **En applications quantitatives, et lors de la première utilisation du Kit** (et à chaque nouveau lot ou à intervalles réguliers à déterminer selon la fréquence d'utilisation du kit), réaliser le plan de plaque suivant :

	Mix FQ 1	Mix FQ 2	Mix FQ 3	Mix FQ 4	Mix FQ 5	Mix FQ 6	Mix FQ 7	Mix FQ 8	Mix FQ 9	Mix FQ 10	Mix FQ 11	Mix FQ 12
A	Standard FQ 10⁴											
B	Standard FQ 10³											
C	Standard FQ 10²											
D	Standard FQ 10¹											
E	NCS											
F	NC											
G												
H												

Remarque : pour les PCR suivantes, déposer seulement 2 points de la gamme : ADN Standard 10⁴ et 10².

- d. Vortexer les tubes du « Mix FQ reconstitué » puis centrifuger rapidement avant ouverture
- e. Déposer **20 µL de Mix FQ reconstitué** dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai
- EPC** : Déposer **5 µL d'ADN Standard** :
 - **Applications qualitatives : 10⁴**
 - **Applications quantitatives : 10⁴ à 10¹ ou 10⁴ et 10².**
 - Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon ou de NCS** (ADN extrait) dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - NC** : Déposer **25 µL de Mix FQ reconstitué** dans la cupule réservée au NC.
- f. Couvrir la plaque avec un Adhesive Cover et placer la microplaque PCR dans le thermocycleur et lancer l'amplification selon le programme suivant :
- Etape 1 : 50°C – 2 minutes – Répétition : 1**
 - Etape 2 : 95°C – 10 minutes – Répétition : 1**
 - Etape 3 : 95°C – 15 secondes puis 60°C – 1 minute – Répétitions : 40**

Interprétation des résultats (cf § VIII ci-dessous)

Nous sommes à votre disposition pour examiner vos résultats, vous pouvez nous envoyer par email le fichier à l'adresse suivante : contact@lsivet.com

■ APPLICATION QUALITATIVE

Les critères de validation sont les suivants pour une application qualitative :

	Ct FQ	INT FQ	Ct IPC	INT IPC
« standard FQ » 10^4	22 < Ct < 32	Positif	Ct < 40	Positif
NCS	Ct > 40	Négatif	Ct > 40	Négatif
NC	Ct > 40	Négatif	Ct > 40	Négatif

Le « standard FQ » 10^4 doit avoir des Ct reproductibles d'une PCR à la suivante.

■ APPLICATION QUANTITATIVE

Les critères de validation (validation efficacité et PCR) sont les suivants pour une application quantitative :

	Ct FQ	INT FQ	Ct IPC	INT IPC
« standard FQ » 10^4	22 < Ct < 32	Positif	Ct < 40	Positif
« standard FQ » 10^3	Ct < 40	Positif	Ct < 40	Positif
« standard FQ » 10^2	Ct < 40	Positif	Ct < 40	Positif
« standard FQ » 10^1	Ct < 40 ou Ct > 40	Pos ou Nég	Ct > 40	Négatif
NCS	Ct > 40	Négatif	Ct > 40	Négatif
NC	Ct > 40	Négatif	Ct > 40	Négatif

VIII – Interprétations**■ APPLICATION QUALITATIVE**

Ct FQ	Ct GAPDH	Interprétation
Ct éch < 40	Ct éch < 40	Positif
Ct éch < 40	Ct éch > 40	Positif inhibé
Ct éch > 40	Ct éch < 40	Négatif
Ct éch > 40	Ct éch > 40	Inhibé

Conduite à tenir pour les échantillons inhibés :

En cas de présence d'inhibiteurs (IPC négatif) :

- 1/ Diluer l'ADN de l'échantillon au 1/10 : 5 µl d'ADN « non validé » + 45 µl d'eau RNase free.
- 2/ Faire une nouvelle analyse PCR sur 5 µl de cette dilution.
- 3/ Si l'ADN « non validé » dilué est positif ou négatif en FQ avec un résultat IPC positif (Ct IPC < 45), le résultat obtenu est alors validé.
- 4/ Si l'ADN « non validé » dilué est négatif avec un résultat IPC négatif (Ct IPC > ou = 45), le résultat obtenu est toujours non validé. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon « non validé » en le pré-diluant au 1/10 dans de l'eau RNase free avant extraction.

En cas de présence importante et fréquente d'inhibiteurs, vous pouvez diluer systématiquement vos ADN au 1/10.

■ APPLICATION QUANTITATIVE

L'objectif de la quantification est d'évaluer le niveau d'excrétion des animaux et ceci pour différentes voies d'excrétion :

- Lait : Excrétion évaluée en nombre de bactéries par ml de lait
- Ecouvillon : Excrétion évaluée en nombre de bactéries par écouvillon élué dans 1 ml de PBS.
- Mucus vaginal, liquide foetal : Excrétion évaluée en nombre de bactéries par ml de liquide.
- Tissu, organe : Excrétion évaluée en nombre de bactéries par gramme (g) de tissu ou d'organe.

Unités de mesure de l'excrétion :

Nature de l'échantillon	Valeur de l'unité
Lait	ml de lait
Ecouvillon vaginal ou cervical	ml (ou écouvillon)
Mucus vaginal ou liquide foetal	ml de mucus ou de liquide
Tissu foetal ou organe	gramme (g)

Interprétations de la quantification :

L'interprétation quantitative est réalisée après avoir analysé les résultats avec le Fichier Excel « **Quantisoft** » fourni par LSI. Cette interprétation n'est réalisable que sur des échantillons dont le Ct de l'IPC est positif, et s'exprime par unité de mesure (cf tableau ci-dessus).

Titre <i>Coxiella</i> / ml	Interprétation	Conduite à tenir sur Ecouvillon, Placenta ou liquide foetal	Conduite à tenir sur le lait (Lait individuel LI- ou lait de Tank – LT)
> 10 ⁴	Excrétion élevée	Avortement à <i>Coxiella</i>	Animal (LI) ou troupeau (LT) fortement excréteur
Entre 10 ² et 10 ⁴	Excrétion modérée	<i>Coxiella</i> susceptible d'être responsable de l'avortement A confirmer sur d'autres prélèvements	Animal (LI) ou troupeau (LT) excréteur
Entre 10 ⁰ et 10 ²	Charge bactérienne inférieure à la limite de quantification	Charge bactérienne non significative	Charge bactérienne non significative
0	Négatif	/	/

Remarque : si l'échantillon est positif pour la cible FQ (Ct FQ < 40) et que son IPC est négatif (Ct GAPDH > 40), cet échantillon ne peut-être quantifié à l'aide du logiciel QUANTISOFT. L'interprétation sera : « échantillon positif inhibé non quantifiable ».