

PCR License

This product is offered under a licence 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.

PCR
PCR

TaqMan
TaqMan

Attention
Modification de la notice
p10.

Kit TaqVet™ Triplex

Coxiella burnetii QUANTITATIVE / *Chlamydophila* spp

Réf : TFQQCHP-CY5

Détecteur IPC : CY5

**Pour détection de *Coxiella burnetii* et de
Chlamydophila spp dans :**

Placenta ou écouvillon placentaire

Ecouvillon vaginal et cervical

Foetus

Liquide foetal

Lait

Mucus Vaginal

**par utilisation de sondes TaqMan®
en PCR temps réel**

Kit développé en partenariat avec le Laboratoire
Vétérinaire Départemental des Deux Sèvres



LASA
LABORATOIRE D'ANALYSES ET DE SÉCURITÉ ALIMENTAIRE



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

Support Techniques PCR / PCR Technical Information

Sandrine MOINE – sandrine@lsivet.com

Mylène SALUS – mylene@lsivet.com

Julie CHARROT – jcharrot@lsivet.com

Informations ELISA / ELISA Information

Support Techniques ELISA / ELISA Technical Information

Laura FOURNIER – laura@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 triplex *Coxiella burnetii* QUANTITATIVE / *Chlamydophila spp*

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. Extraction de l'ADN	7
VI. Reconstitution des Mix réactionnels	9
VII. Protocole d'amplification	9
VIII. Interprétation des résultats	10

Kit TaqVet triplex *Coxiella burnetii* Quantitative / *Chlamydophila spp*

Pour détection de la Fièvre Q et *Chlamydophila spp* dans les placentas, les foetus, les liquides foetaux, les laits et les mucus vaginaux par utilisation de sondes TaqMan® en PCR temps réel

Réf : TFQQCHP-CY5

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.
- d'une excrétion chronique de bactéries dans leurs déjections et dans leur lait.

Selon Euzéby, J.P. : Dictionnaire Bactériologie Vétérinaire (mise à jour du 140101). <http://www.bactério.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 P3 et qui souhaitent réaliser des analyses *Coxiella burnetii* d'inactiver des échantillons avant traitement (chauffage minimum à 90°C pendant 30 min).

2/ *Chlamydophila* et *Chlamydia spp* :

La famille I des Chlamydiaceae comprend deux genres :

- le genre *Chlamydia* constitué des espèces *C.trachomatis*, *C. muridarum* et *C suis*,
- le genre *Chlamydophila* constitué des espèces *Cph. psittaci*, *Cph. abortus*, *Cph. felis*, *Cph. caviae*, *Cph. pecorum* et *Cph pneumoniae*.

Les *Chlamydophila spp* sont responsables de nombreuses maladies chez les ruminants et notamment d'avortements et de pathologies génitales.

3/ Kit TaqVet triplex *Coxiella burnetii* / *Chlamydophila spp* :

Le kit Taqvet triplex *Coxiella burnetii*/ *Chlamydophila spp* a été développé en partenariat avec le Laboratoire Vétérinaire Départemental des Deux Sèvres.

Il permet la détection simultanée de :

- la séquence transposon, qui est répétée 20 fois dans le génome de *Coxiella burnetii*,
- la séquence 23S codant pour le domaine I du gène ribosomal, spécifique du genre *Chlamydia* et *Chlamydophila* (détection de *Cph.psittaci*, *Cph. abortus*, *Cph. pecorum*, *Cph. felis*, *Cph. caviae*, *C. suis*, *Cph.pneumoniae*, *C.muridarum*, *C. trachomatis*).

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

La détection spécifique simultanée de l'ADN de *Coxiella burnetii*, de l'ADN de *Chlamydophila spp* et la détection de l'IPC (Internal Positive Control) est réalisée dans une même 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 présent dans les placentas, écouvillons, foetus, liquides foetaux et laits.

L'EPC est un antigène purifié inactivé. L'EPC ne contient pas la séquence de l'IPC. L'EPC est à extraire avec le diluant pour observer une réponse IPC.

Le Kit TaqVet *Coxiella burnetii* Quantitative / *Chlamydomphila spp* contient :

- 1 **mix (SEQ FQ/Chlam/IPC)** contenant, un set de nucléotides spécifiques de la Fièvre Q, un set de nucléotides spécifiques de *Chlamydomphila spp* ainsi que le set de nucléotides spécifique de l'IPC :
 - 🧪 1 set de Nucléotides FQ :
 - 1 Forward Primer
 - 1 Reverse Primer
 - 1 Sonde FQ - Sonde TaqMan® marquée VIC-MGB.
 - 🧪 1 set de Nucléotides *Chlamydomphila spp* :
 - 1 Forward Primer
 - 1 Reverse Primer
 - 1 Sonde Chlam – Sonde TaqMan® marquée FAM-MGB.
 - 🧪 1 set de Nucléotides IPC :
 - 1 Forward Primer
 - 1 Reverse Primer
 - 1 Sonde IPC - Sonde TaqMan® marquée CY5-BHQ
- 1 **EPC FQ/Chlam** (External Positive Control).
- 1 Flacon de **Master Mix** pour PCR TaqMan® ADN.
- 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).
- Le Kit TaqVet triplex *Coxiella burnetii* Quantitative/*Chlamydomphila spp* a été validé avec ABIPRISM® 7500 (Applied Biosystems), MX3000P et MX3005P (Stratagene), Chromo 4 (Biorad), LightCycler® LC480 (Roche®), et SLAN (LSI™).
- Les résultats sont interprétés en fonction des Ct (Treshold 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* quantitative / *Chlamydomphila spp* se présente sous la forme d'un coffret (composants à -20°C) permettant la réalisation de 100 tests en monocupule. Chaque kit contient les réactifs suivants :

Nom	Présentation	Conservation	Code Couleur
Master Mix	1 Tube de 2 mL	-20°C / +4°C *	Gris
SEQ FQ/Chlam/IPC	1 Tube de 0,5 mL	-20°C	Vert
EPC FQ/Chlam	1 Tube de 0,5 mL	-20°C	Bleu
Diluant EPC	1 Tube de 2 mL	-20°C	Violet

Master Mix : Mix réactionnel pour PCR TaqMan® ADN. * *A conserver à -20°C à réception et à +4°C après décongélation.*

SEQ FQ/Chlam/IPC : Pool des primers et sondes spécifiques de la Fièvre Q, de *Chlamydomphila spp* et de l'IPC.

EPC FQ / Chlam : External Positive Control Fièvre Q / *Chlamydomphila spp* : Positif en PCR Fièvre Q / *Chlamydomphila spp*.

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 : Negative 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 chaque mix reconstitué 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 Étuve 70°C.
- o 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'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.

Prélèvements

Type d'échantillon	Matériel de prélèvement
Placenta	20 mg de placenta
Foetus	20 mg de fœtus
Liquide foetal	200 µL de liquide foetal
Lait	200 µL de lait bromopolé
Mucus Vaginal	200 µL de mucus

1/ Tissu :

Le tissu 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 tissu :

1. Disséquer finement le morceau de tissu dans une boîte de Petri stérile à l'aide de pinces et d'un bistouri stérile.
2. Dans un microtube de 1,5 mL, peser **20 mg** maximum de tissu 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 tissu - Cf. Chapitre V - Extraction de l'ADN.

Il est également possible de broyer le placenta ou le tissu fœtal 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 « § 4 / Mucus vaginal - Ecouvillon ».

2/ Liquide foetal :

Le liquide 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).

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

3/ 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.

4/ Mucus Vaginal / Ecouvillon :

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 le tube contenant l'écouvillon.
2. Vortexer 1 minute à vitesse maximum.
3. Enlever l'écouvillon en l'écrasant sur la paroi.
4. Récupérer et stocker le PBS contenant le mucus dans un tube Eppendorf 1.5 mL.

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 les consignes de manipulations 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 placenta ou des foetus) lors de l'extraction,
- multiplier les contrôles négatifs.

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

Extraction des 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 10^4 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 10^3 , 10^2 et 10^1 bactéries/mL.

Le protocole de dilution est indiqué ci-dessous.

Les ADN à 10^3 , 10^2 et 10^1 bactéries/mL sont à aliquoter sous un volume de 50 µL et à stocker à -20°C ou -80°C.

NCS (Contrôle Négatif « Sample ») : Le NCS est à extraire en même temps que les échantillons.

NC : Negative Control : Distribuer directement 20 µL de « Mix TFQQCHP » dans la plaque d'amplification.

Protocole Colonne Extraction de Liquides, Cellules

V.1 - Extraction avec le Kit QIAamp DNA Mini kit de Qiagen

1. Régler une étuve à 70°C.
2. Préparation des échantillons :

✚ **Tissu (Placenta, Tissu foetal, Organe) :** 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.

✚ **EPC - Lait - 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 d'EPC, de lait, de mucus ou d'éluât d'écouvillon, de 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 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.

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 avec le kit Nucleospin Tissue de Macherey Nagel

1. Régler une étuve à 70°C.
2. Préparation des échantillons :

✚ **Tissu (Placenta, Tissu foetal, Organe)** : 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.

✚ **EPC - Lait - 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 d'EPC, de lait, de mucus** ou **d'eluât d'écouvillon, de 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 11 000 g pendant 1 min.

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.

VI - Reconstitution des Mix réactionnels

Avant la réalisation de la réaction PCR, il est nécessaire de reconstituer le «Mix TFQQCHP» à partir des réactifs communs (Master Mix, Eau DNase - RNase Free, Séquences FQ/CHLAM/IPC).

Dans chaque Kit, un tableau de reconstitution du Mix est fourni avec le certificat du contrôle qualité.

Ne pas conserver les Mix réactionnels reconstitués.

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

VII - Protocole d'amplification

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

a. Utiliser « ROX » comme « Passive Reference » et créer 3 « Detectors » :

FQ : Reporter VIC, Quencher : None.

CHLAM : Reporter FAM, Quencher : None.

IPC : Reporter CY5, Quencher : None.

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

	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard FQ 10 ⁴ / Chl											
B	NCS1											
C	NC											
D	Ech 1											
E	Ech 2											
F	...											
G												
H												

c. **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 :

Attention : Pour les PCR suivantes, déposer seulement 2 points de la gamme standard :

ADN Standard 10⁴ et ADN Standard 10²

	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix	Mix
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Standard FQ 10 ⁴ / Chl											
B	Standard FQ 10 ³ / Chl											
C	Standard FQ 10 ² / Chl											
D	Standard FQ 10 ¹ / Chl											
E	NCS1											
F	NC											
G	Ech 1											
H	Ech 2											

2. Vortexer les tubes du « Mix TFQQCHP » puis centrifuger rapidement avant ouverture. Ne pas oublier que la réaction est réalisée en monocupule.

3. Déposer **20 µL de « Mix TFQQCHP »** dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.

1. **EPC** : Déposer **5 µL d'ADN Standard** :
 - **Applications qualitatives : 10⁴**
 - **Applications quantitatives : 10⁴ à 10¹ ou 10⁴ et 10².**
2. **Echantillons et NCS1 et NCS2** : Déposer **5 µL d'échantillon ou de NCS** (ADN extrait) dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
3. **NC** : Déposer **25 µL de « Mix TFOQCHP »** dans la cupule réservée au NC.

4. Couvrir la plaque avec un Adhesive Cover et placer la microplaque PCR dans le thermocycleur et lancer l'amplification selon le programme suivant :

4. **Etape 1 : 50°C – 2 minutes – Répétition : 1**
5. **Etape 2 : 95°C – 10 minutes – Répétition : 1**
6. **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@sivet.com

VIII – Interprétations

Validation du test

Contrôler que l'EPC FQ est positif :

| Ct EPC FQ / « Detector » FQ < 40.

Contrôler que l'EPC Chlam est positif :

| Ct EPC Chlam / « Detector » Chlam < 40.

Contrôler que les Contrôles Négatifs sont négatifs :

| Ct NCS / « Detector » FQ > 40.
| Ct NCS / « Detector » Chlam > 40.
| Ct NCS / « Detector » IPC > 40.

| Ct NC / « Detector » FQ > 40.
| Ct NC / « Detector » Chlam > 40.
| Ct NC / « Detector » IPC > 40.

APPLICATION QUALITATIVE

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

Ct FQ	Ct Chlam	Ct IPC	Interprétation
Ct éch < 40	Ct éch < 40	Ct éch < 40	Positif
Ct éch < 40	Ct éch < 40	Ct éch > 40	Positif inhibé
Ct éch > 40	Ct éch > 40	Ct éch < 40	Négatif
Ct éch > 40	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 < 40), le résultat obtenu est alors validé.
- 4/ Si l'ADN « non validé » dilué est négatif avec un résultat IPC négatif (Ct IPC > ou = 40), 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**1. Quantification absolue :**

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

	Ct FQ	INT FQ
« standard FQ » 10⁴	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif
« standard FQ » 10³	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif
« standard FQ » 10²	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif
« standard FQ » 10¹	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Pos ou Nég
NCS	Ct > 40	Négatif
NC	Ct > 40	Négatif

Efficacité PCR FQ	85-115%
--------------------------	---------

Ct CQ : Ct du contrôle qualité fournis avec le kit

Statut des échantillons après PCR :

Ct FQ	Ct IPC	Interprétation	Quantification absolue
Ct éch < 40	Ct éch < 40	Positif	Valeur calculée par le thermocycler*
Ct éch < 40	Ct éch > 40	Positif inhibé	Valeur calculée par le thermocycler*
Ct éch > 40	Ct éch < 40	Négatif	/
Ct éch > 40	Ct éch > 40	Inhibé	/

***Valeur calculée par le thermocycler :** il faut intégrer en standard, les valeurs de la gamme 10⁴ à 10¹. Le logiciel du thermocycler calculera automatiquement la quantité de bactéries/mL dans les échantillons positifs. Nous sommes à votre disposition pour toutes questions sur cette étape (email : contact@lsivet.com).

2. Quantification relative :

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

	Ct FQ	INT FQ	Ct IPC	INT IPC
« standard FQ » 10⁴	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif
« standard FQ » 10³	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif
« standard FQ » 10²	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Positif
« standard FQ » 10¹	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Pos ou Nég	Ct = Ct CQ +/- 3 Ct	Pos ou Nég
NCS	Ct > 40	Négatif	Ct > 40	Négatif
NC	Ct > 40	Négatif	Ct > 40	Négatif

Efficacité PCR FQ	85-115%
Efficacité PCR IPC	85-115%

Ct CQ : Ct du contrôle qualité fournis avec le kit

Statut des échantillons après PCR :

Ct FQ	Ct IPC	Interprétation	Quantification relative
Ct éch < 40	Ct éch < 40	Positif	QUANTISOFT*
Ct éch < 40	Ct éch > 40	Positif inhibé	Q relative impossible
Ct éch > 40	Ct éch < 40	Négatif	/
Ct éch > 40	Ct éch > 40	Inhibé	/

***QUANTISOFT** : Logiciel LSI de quantification basée sur la formule de Pfaffl et fournis sur demande. Nous sommes à votre disposition pour toutes questions sur ce logiciel (email : contact@lsivet.com).

Interprétations de la quantification :

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 fœtal : 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 fœtal	mL de mucus ou de liquide
Tissu fœtal ou organe	gramme (g)

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 écouvillon, 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 ».