



www.biosellal.com

**Support Technique**

tech@biosellal.com +33 (0) 4 26 78 47 62

**Renseignements et commandes**

contact@biosellal.com +33 (0) 4 26 78 47 60



MANUEL D'UTILISATION

**Bio-T kit<sup>®</sup>**  
*Coxiella burnetii & Chlamydia abortus*

Cat. N° BioTK039

50 réactions

**Détection et quantification de *Coxiella burnetii* et détection de *Chlamydia abortus* par PCR en temps réel (qPCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène**

**RUMINANTS**

**Types de prélèvements**

- Mucus vaginal/endocervical, cotylédons placentaires prélevés sur écouvillons secs, avec embout viscosé et tige souple en plastique,
- Organes de fœtus : poumons, foie
- Liquide stomacal fœtal
- Lait
- Conservation recommandée des échantillons : à 4°C 7 jours maximum, à -20°C au-delà de 7 jours, voire -70°C si conservation au-delà de 1 an.

**Extractions ADN recommandées par BioSella**

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract<sup>®</sup> SuperBall<sup>®</sup> Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract<sup>®</sup> Column Cat. N° BEC050/ BEC250, Qiagen -QIAamp<sup>®</sup> DNA mini kit Cat N°51304)

Données de performances disponibles, contacter le Support Technique.

L'utilisation de ces kits d'extraction a été validée par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour les matrices de type mucus vaginal, endo-cervical ou de cotylédons placentaires pour les bovins, caprins et ovins prélevés sur écouvillons secs (dossier de validation disponible sur demande).

D'autres kits d'extraction sont utilisables : contacter le Support Technique pour plus d'informations.

*Réservé à l'usage vétérinaire*



Notes :

Notes :

## PRESENTATION

## Description du produit

*Coxiella burnetii*, bactérie Gram négatif intracellulaire stricte, est responsable d'avortements chez les ruminants pouvant entraîner des pertes économiques importantes. Elle est l'agent responsable de la fièvre Q, une zoonose dont les ruminants constituent le réservoir majeur des infections humaines.

Si les *Chlamydia* sont responsables de diverses pathologies chez les ruminants (conjonctivites, arthrites, encéphalomyélites, entérites, pneumonies), c'est bien l'expression abortive qui domine en termes de fréquence et d'impact économique. Les avortements sont observés essentiellement chez les petits ruminants d'élevage (avortement enzootique des petits ruminants) avec l'implication principalement de *Chlamydia abortus*. *Chlamydia abortus* (anciennement *Chlamydophila abortus*) est une bactérie intracellulaire appartenant à la famille des *Chlamydiaceae* et à l'ordre des *Chlamydiales*. Elle possède un tropisme privilégié pour le placenta.

A noter qu'il est fréquent d'observer chez ces espèces animales des avortements associant à la fois *C. abortus* et *C. burnetii*.

Le Bio-T kit® *Coxiella burnetii* & *Chlamydia abortus* (Cat. N° BioTK039) permet de **détecter dans le même puits réactionnel, la présence** :

- de ***Coxiella burnetii*** grâce à un marquage 6-FAM,
- de ***Chlamydia abortus*** grâce à un marquage VIC,
- d'un **IPC endogène**, grâce à un marquage CY5 qui permet de confirmer la présence de cellules de ruminants en quantité suffisante sur les écouvillons, de valider l'extraction des acides nucléiques et l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Ce kit a été développé et validé suivant les prescriptions de la **norme NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR** et les **recommandations de l'ANSES de Sophia Antipolis**, LNR pour *Coxiella burnetii*. **Le dossier de validation et le mode opératoire ont été examinés par le LNR-FQ pour la partie *Coxiella burnetii*, lequel a fourni une attestation de validation, à disposition avec le dossier.**

Détection qualitative de *Chlamydia abortus*

Le kit *Coxiella burnetii* & *Chlamydia abortus* (Cat. N° BioTK039) est conçu pour une **détection qualitative de *Chlamydia abortus*** à savoir : présence détectée ou non détectée, sans quantification.

Détection et Quantification de *Coxiella burnetii*

Les Tableaux 1 et 2 ci-dessous présentent le type de détection recommandé en fonction du type d'échantillons à analyser ainsi que le principe d'analyse dans le cadre d'une détection quantitative absolue et relative.

**Tableau 1. Type d'analyse pour le Bio-T kit® *C. burnetii* & *C. abortus* (Cat. N° BioTK039)**

Types de prélèvements	Espèces	Type de détection	Type de contrôle positif d'extraction requis
Lait, organes de fœtus, liquide stomacal fœtal	Ruminants	Détection <b>qualitative</b>	MRI (Matériau de Référence Interne)
Ecouvillons endo-cervicaux, vaginaux ou de cotylédons placentaires*	Bovins, Ovins, Caprins	Détection <b>quantitative</b> (absolue ou relative)	MRSI (Matériau de Référence au Seuil d'Interprétation)

\* Dossier de validation disponible sur demande au Support Technique.

Le MRSI est constitué par une suspension bactérienne de *Coxiella burnetii* fournie par le LNR-FQ, diluée dans du PBS ou dans une suspension d'écouvillons négatifs pour la cible. La concentration bactérienne requise pour le MRSI dépend du type d'analyse : 10<sup>4</sup> GE/ml pour les analyses individuelles, 10<sup>3</sup> GE/ml pour les analyses de mélanges. Un mélange est constitué par soit 3 écouvillons individuels chez les petits ruminants soit par 3 écouvillons de cotylédons placentaires d'un placenta chez les bovins.

Les niveaux de 10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> GE/ml correspondent aux seuils fixés pour le diagnostic d'avortement (les prélèvements devant être réalisés moins de 8 jours après avortement). Le niveau 10<sup>4</sup> GE/ml est aussi utilisé pour les investigations épidémiologiques à la suite de cas groupés avérés.

Le MRI peut être constitué soit par une suspension bactérienne de *C. burnetii* diluée dans de la matrice négative (lait, exsudat d'organes,...) pour la cible ou du PBS, comme décrit pour le MRSI, soit par un échantillon positif pour la cible, caractérisé en terme de valeur de Ct.

**Tableau 2. Principe d'analyse pour la détection quantitative de *C. burnetii***

Quantification	Objectif	Référence
<b>Absolue</b>	Détermination de la concentration de <i>C. burnetii</i> en GE/ml	Gamme d'ADN standard IS1111 (ADN de synthèse) reliant les valeurs de Ct et la concentration de <i>C. burnetii</i> en GE/ml ADN standard = EPC (contrôle positif externe, fourni à une concentration stock exprimée en GE/ml)*
<b>Relative</b>	Comparaison des valeurs de Ct obtenues pour les échantillons avec la valeur de Ct obtenue pour le MRSI extrait. Dédution de la concentration / à celle du MRSI	Matériau de Référence au Seuil d'Interprétation (MRSI) = suspension bactérienne de <i>C. burnetii</i> fournie par le LNR-FQ, ramenée à 10 <sup>4</sup> bactéries/écouvillon (10 <sup>4</sup> GE/ml) pour les analyses individuelles ou 10 <sup>3</sup> bactéries/écouvillon (10 <sup>3</sup> GE/ml) pour les analyses de mélanges (3 individus ou 3 écouvillons)

\* L'ADN standard (EPC, contrôle positif externe) est fourni à une concentration stock (exprimée en GE/ml) et doit être dilué pour générer la gamme étalon. Sa concentration a été raccordée avec celle du Matériel de Référence ADN *Coxiella burnetii*, titré et fourni par le LNR-FQ de Sophia Antipolis.

## • Lecture des Echantillons

- 1) Suivre les règles de lecture des échantillons présentées dans le Tableau 11 (cf Analyse qualitative).
- 2) Interpréter les résultats en fonction de la valeur de Ct obtenue pour le MRSI, comme indiqué dans le Tableau 16.

**Tableau 16. Interprétation des résultats qPCR *C. burnetii* en quantification relative**

Résultats qPCR	Interprétation
Négatif	<b>Non détecté</b> Quantité de GE < LD <sub>PCR</sub>
Positif Ct > Ct MRSI <sup>‡</sup>	<b>Positif* : Quantité de cible &lt; à celle du MRSI<sup>‡</sup></b>
Positif Ct = Ct MRSI <sup>‡</sup>	<b>Positif: Quantité proche de celle du MRSI<sup>‡</sup></b>
Positif Ct < Ct MRSI <sup>‡</sup>	<b>Fort Positif* : Quantité de cible &gt; à celle du MRSI<sup>‡</sup></b>

\* Se reporter au Tableau 13.

‡ En incluant l'intervalle d'incertitude de mesure.

Il est recommandé de suivre la valeur de Ct du MRSI en carte de contrôle pour s'assurer de la fidélité du processus analytique avec pour limite d'incertitude élargie ± 2.33 Ct.

## Relative

L'analyse relative est établie d'après la valeur de Ct obtenue pour le MRSI : Analyse comparative des valeurs de Ct *C. burnetii* obtenues pour les échantillons par rapport à la valeur de Ct obtenue pour le matériel de référence (MR) au seuil de 10<sup>4</sup> GE/ml pour les analyses individuelles ou de 10<sup>3</sup> GE/ml pour les analyses de mélange.

### • Lecture des Contrôles

Tableau 15. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles		Interprétation
	<i>C. burnetii</i> (FAM)	IPC endogène (VIC)	
<b>NC</b> Contrôle Négatif d'amplification	Neg	Neg	<b>Validé</b>
<b>FACULTATIF</b>	Neg / Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix.</li> </ul>
<b>NCS</b> Contrôle Négatif de processus	Neg	Neg	<b>Validé</b>
<b>OBLIGATOIRE</b>	Neg / Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de plaque.</li> </ul>
<b>EPC</b> Contrôle Positif d'amplification <i>C. burnetii</i> / <i>C. abortus</i> déposé sous forme de gamme	Pos Ct conforme au Certificat d'Analyse	Neg	<b>Validé</b>
<b>OBLIGATOIRE</b>	Neg	Neg	<ul style="list-style-type: none"> <li>Problème lors de la PCR : Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?</li> </ul>
<b>OBLIGATOIRE</b>	Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.</li> </ul>
<b>MRSI</b> Contrôle Positif de processus et référence de quantification	Pos Ct conforme à l'intervalle de tolérance (se reporter au dossier de validation)	Pos Ct < 35	<b>Validé</b>
<b>OBLIGATOIRE</b>	Neg	Neg/Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oubli d'addition d'ADN extrait ou dépôt non au contact du MM dans le puits réactionnel ?</li> <li>Dérive du processus : extraction et/ou PCR</li> <li>Dégradation de l'échantillon contrôle ?</li> <li>Problème lors de l'extraction ?</li> </ul>

Rappel : L'IPC a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants donc il ne pourra être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC. Il sera détecté dans le MRSI si celui-ci a été préparé à partir de matrice négative, il ne sera pas détecté si la matrice a été remplacée par du PBS.

## Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 3. Descriptif du contenu du kit

Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
<b>Master Mix (MM)</b> prêt à l'emploi	MMFQCHAB-A	750 µl	1 tube bouchon blanc Sachet A	-20°C à l'abri de la lumière Zone « MIX »
<b>External Positive Control (EPC)</b> = contrôle positif d'amplification de <i>Coxiella burnetii</i> et de <i>Chlamydia abortus</i>	EPCFQCHAB-A	110 µl	1 tube bouchon orange Sachet B	-20°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
<b>Eau</b> RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	1 tube bouchon bleu Sachet B	4°C ou -20°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

## Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 4. Consommables et réactifs non fournis dans le kit

Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
<b>Ecouvillons*</b>	Embout viscosse, tige plastique souple	COPAN Diagnostics	155C
<b>Tube 1.5 ml*</b>	Microtube safelock PP 1,5 ml	Eppendorf	0030120086
<b>Tampon ATL</b>	Tampon de Lyse	BioSella	ATL19076
<b>BioExtract® Column</b>	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50 ou 250)	BioSella	BEC050 / BEC250
<b>BioExtract® SuperBall®</b>	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSella	BES384
<b>QIAamp® DNA mini kit</b>	Kit d'extraction ADN format colonne (50)	Qiagen	51304

\* Références données à titre indicatif.

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

## Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de la PCR en temps réel (qPCR)

### Etape 1 :

Préparation des échantillons et Lyse des cellules incluant les bactéries.

### Etape 2 :

Extraction/Purification des acides nucléiques.

### Etape 3 :

Dépôt du Master Mix dans les puits de la plaque ou des barrettes de qPCR.

Ajout des extraits d'acides nucléiques.

### Etape 4 :

PCR en temps réel (qPCR) : amplification et détection simultanée des ADN cibles *C. burnetii*, *C. abortus* et IPC avec analyse qualitative (*C. abortus*, *C. burnetii*) et quantitative (*C. burnetii*) (cf Tableaux 1-2).

## Principales précautions à appliquer

- A réception des prélèvements, **désinfecter l'extérieur des contenants à l'aide d'un sporicide avant de stocker et/ou de manipuler sous le PSM.**
- Lors de l'extraction, **il est obligatoire de travailler sous PSM jusqu'à la fin de l'étape de lyse des échantillons, en raison du risque zoonotique associé aux types d'échantillons manipulés et à la présence potentielle de *Coxiella burnetii* et ses propriétés aérolisables.**
- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (blouse, gants jetables (système de double paire), lunettes de protection, masque FFP3...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des MM prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des AN extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex,...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à -20°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger rapidement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs avant utilisation.
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats et des AN extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.

## • Lecture des Echantillons

- 1) Suivre les règles de lecture des échantillons présentées dans le Tableau 11 (cf Analyse qualitative).
- 2) Interpréter les résultats en fonction de la concentration en *C. burnetii* déterminée, comme indiqué dans les Tableaux 13 et 14.

Tableau 13. Interprétation des résultats		
Valeurs de concentration (bactéries ou GE/écouvillon ou ml)	Expression des résultats	Interprétation Domaine d'application : Epidémiologique ou Diagnostique
Aucun signal ou < LD <sub>METHODE</sub>	Non Détecté ou inférieur à la LD <sub>METHODE</sub>	Négatif ou Inférieur à la LD <sub>METHODE</sub>
< LQ <sub>METHODE</sub> et > LD <sub>METHODE</sub>	Déecté en quantité inférieure à la LQ <sub>METHODE</sub>	Positif faible <i>C. burnetii</i> n'est pas considérée comme étant à l'origine de l'avortement
< LQ <sub>MAX</sub> et > LQ <sub>METHODE</sub>	Déecté Valeur déduite de bactéries / écouvillon	Positif si compris entre LQ <sub>METHODE</sub> et 10 <sup>4</sup> en individuel ou 10 <sup>3</sup> en mélange* <i>C. burnetii</i> n'est pas considérée a priori comme responsable de l'avortement – à confirmer par d'autres analyses
		Positif fort si ≥ 10 <sup>4</sup> en individuel (ou 10 <sup>3</sup> en mélange*) <i>C. burnetii</i> est considérée comme étant à l'origine de l'avortement (dans le lot considéré)
> LQ <sub>MAX</sub>	Déecté en quantité supérieure à la LQ <sub>MAX</sub>	Positif fort <i>C. burnetii</i> est considérée comme étant à l'origine de l'avortement (dans le lot considéré)

\* Mélange de 3 individus ou 3 écouvillons d'un placenta.

Tableau 14. Résumé des caractéristiques de quantification des méthodes validées (GE/ml)			
Droite de calibration : R <sup>2</sup> >0.9 et Efficacité de PCR entre 85 et 115 %			
Valeurs Méthode	BioExtract® Column	QIAamp® DNA mini kit	BioExtract® SuperBall®
LD <sub>METHODE</sub>	600	400	400
LQ <sub>METHODE</sub>	800	500	500
LQ <sub>MAX</sub>	5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>6</sup>

• Lecture des Contrôles

EXTRACTION D'ADN

Tableau 12. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles			
	Cibles		Interprétation
	<i>C. burnetii</i> (FAM)	IPC endogène (VIC)	
<b>NC</b> Contrôle Négatif d'amplification	Neg	Neg	Validé
<b>FACULTATIF</b>	Neg / Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix.</li> </ul>
<b>NCS</b> Contrôle Négatif de processus	Neg	Neg	Validé
<b>OBLIGATOIRE</b>	Neg / Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de plaque.</li> </ul>
<b>EPC</b> Contrôle Positif d'amplification <i>C. burnetii</i> / <i>C. abortus</i> déposé sous forme de gamme	Pos Ct conformes au Certificat d'Analyse  Droite de Calibration Efficacité de PCR comprise entre 85 et 115% $R^2 > 0.9$	Neg	Validé
	Neg	Neg	<ul style="list-style-type: none"> <li>Problème lors de la PCR : Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?</li> </ul>
	Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.</li> </ul>
<b>MRSI ou MRI</b> Contrôle Positif de processus	Pos Quantité conforme dans l'intervalle de tolérance	Pos Ct < 35	Validé
	Neg	Neg/Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oubli d'addition d'ADN extrait ou dépôt non au contact du MM dans le puits réactionnel ?</li> <li>Dérive du processus : extraction et/ou PCR</li> <li>Dégradation de l'échantillon contrôle ?</li> <li>Problème lors de l'extraction ?</li> </ul>

Rappel : L'IPC a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants donc il ne pourra être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC. Il sera détecté dans le contrôle positif de processus (MRSI/MRI) si celui-ci a été préparé à partir de matrice négative, il ne sera pas détecté si la matrice a été remplacée par du PBS.

Le processus d'extraction comprend une étape de lyse thermique et enzymatique, avec inactivation de *C. burnetii* et *C. abortus*, suivie de la purification des ADN totaux libérés par adsorption sur colonne de silice ou sur billes magnétiques coatées. Les ADN purifiés élués sont ensuite stockés à 4°C si la PCR est réalisée dans la journée ou à -20°C pour un traitement ultérieur.

BioSellal propose deux kits d'extraction :

- **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)** basé sur l'utilisation de colonnes de silice, préconisé pour l'extraction de 1 à 12-20 échantillons en parallèle.
- **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)** basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation d'automates tels que le KingFisher™ Duo, mL ou Flex, préconisé pour l'extraction en parallèle de 12 échantillons ou plus.

Le kit **QIAamp® DNA mini kit de Qiagen (Cat. N°51304, colonnes de silice)** a également été validé.

Un protocole simplifié pour chaque méthode vous est proposé ci-après. Pour plus d'informations, contacter notre Support Technique ou se reporter au manuel d'utilisation dédié sur [www.biosellal.com](http://www.biosellal.com).

Les données de validation pour chacune de ces méthodes, pour les matrices biologiques de types suspensions de mucus endo-cervical, vaginal ou de cotylédons placentaires, préparées à partir d'écouillons, sont présentées dans le dossier de validation du kit, disponible sur demande auprès de notre Support Technique.

L'extraction des ADN totaux est réalisable avec toute autre technique d'extraction validée.

La mise en place de la méthode peut être accompagnée afin de vérifier les performances attendues. Un protocole d'adoption pour la méthode complète est disponible sur demande.

Le LNR-FQ, fournisseur du matériau de référence pour la cible *C. burnetii*, peut également être sollicité comme Support. La transmission des données d'adoption au LNR-FQ est encouragée par ce dernier pour permettre un meilleur accompagnement des utilisateurs des méthodes (fichier de résultats disponible au LNR).

## Préparation des échantillons avant extraction : sous PSM

### Contrôles requis

Pour chacune des méthodes d'extraction, il est obligatoire d'inclure au moins **un échantillon témoin négatif d'extraction (NCS)**, afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons sur l'ensemble du processus. Il est placé en dernière position, après les échantillons à extraire, et il est recommandé d'adapter le nombre de NCS au niveau de risque d'inter-contamination du laboratoire : par exemple, un NCS tous les 7-10 échantillons terrain.

Pour ce contrôle, la **prise d'essai de 200 µl de suspension écouvillonnaire** est remplacée par **200 µl de PBS ou d'eau (RNase/DNase free)** et est traitée en parallèle des échantillons terrains tout au long du processus d'extraction.

Pour la détection de *C. burnetii*, un **échantillon « contrôle positif » de processus** de type « sentinelle », constitué selon les matrices, par le MRSI ou le MRI, est utilisé pour vérifier l'ensemble de la méthode d'extraction d'ADN et PCR en temps réel (qPCR) (cf Tableaux 1-2).

Cet échantillon est inclus dans chaque série d'extraction. La valeur quantifiée ou le Ct de ce témoin d'extraction peut être reporté et suivi dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qPCR, une valeur quantifiée attendue ou un Ct attendu avec ce témoin positif valide l'ensemble de la mise en œuvre de la méthode correspondante (quantitative ou relative).

### • Lecture des Echantillons

Tableau 11. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
Cibles			Interprétation
<i>C. burnetii</i> (FAM)	<i>C. abortus</i> (VIC)	IPC endogène (CY5)	
Neg Ct>40	Neg Ct>40	Pos Ct <35	Négatif ou Non détecté
Pos Ct<40	Pos Ct<40		Positif ou Détecté
Pos Ct<40	Pos Ct<40	Neg ou Ct >35	Positif ou Détecté <ul style="list-style-type: none"> <li>Absence de cellules en quantité suffisante</li> <li>Présence d'inhibiteurs ?*</li> <li>Compétition avec la cible ?</li> </ul> <i>La quantification relative ou absolue n'est pas possible</i>
Neg Ct>40	Neg Ct>40	Neg ou Ct >35	Ininterprétable <ul style="list-style-type: none"> <li>Oubli d'addition d'ADN extrait ou dépôt non au contact du MM lors de la préparation de la plaque ?</li> <li>Présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ? *</li> <li>Problème de prélèvement (cas des écouvillons) : quantité de cellules insuffisante</li> </ul>

\* En cas de suspicion d'inhibition, 1) répéter la qPCR en pré-diluant l'ADN extrait au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) reprendre l'analyse depuis l'extraction.

### Analyse quantitative (*C. burnetii*) : matrices analytiques de type écouvillons endo-cervicaux, vaginaux et de cotylédons placentaires

⚠ Seuls les échantillons trouvés positifs pour la valence cible (*C. burnetii*) et présentant une valeur de Ct conforme pour l'IPC, peuvent être quantifiés (cf Tableau 11).

### Absolute

L'analyse quantitative c'est-à-dire la détermination de la concentration de *C. burnetii* exprimée en GE/ml des extraits analysés est réalisée en fonction de la droite de calibration établie en parallèle.

Les Tableaux 12 à 14 indiquent les valeurs des différents niveaux de référence et l'interprétation des résultats en fonction de ces niveaux. Se reporter au dossier de validation pour plus de détails.



# INTERPRETATION DES RESULTATS

## Principaux cas de figures

### Analyse qualitative (*C. burnetii* et *C. abortus*) : toutes matrices

- Lecture des Contrôles

Tableau 10. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles				
	Cibles			Interprétation
	<i>C. burnetii</i> (FAM)	<i>C. abortus</i> (VIC)	IPC endogène (CY5)	
<b>NC</b> Contrôle Négatif d'amplification	Neg	Neg	Neg	Validé
<b>FACULTATIF</b>	Neg / Pos	Neg / Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix.</li> </ul>
<b>NCS</b> Contrôle Négatif de processus	Neg	Neg	Neg	Validé
<b>OBLIGATOIRE</b>	Neg / Pos	Neg / Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de plaque.</li> </ul>
<b>EPC</b> Contrôle Positif d'amplification ( <i>C. burnetii</i> et <i>C. abortus</i> )	Pos Ct conforme au Certificat d'Analyse	Pos Ct conforme au Certificat d'Analyse	Neg	Validé
	Neg	Neg	Neg	<ul style="list-style-type: none"> <li>Problème lors de la PCR : Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?</li> </ul>
<b>OBLIGATOIRE</b>	Pos	Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.</li> </ul>
<b>MRI/MRSI</b> Contrôle Positif de processus pour <i>C. burnetii</i>	Pos Ct conforme à la carte de contrôle	Neg	Pos Ct < 35	Validé
	Neg	Neg	Neg/Pos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oubli d'addition d'ADN extrait ou dépôt non au contact du MM dans le puits réactionnel ?</li> <li>Dérive du processus : extraction et/ou PCR</li> <li>Dégradation de l'échantillon contrôle ?</li> <li>Problème lors de l'extraction ?</li> </ul>

Rappel : L'IPC a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants donc il ne pourra être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC. Il sera détecté dans le contrôle positif de processus (MRSI/MRI) si celui-ci a été préparé à partir de matrice négative, il ne sera pas détecté si la matrice a été remplacée par du PBS.

### Echantillons

#### A partir d'écouvillons

- Eluer l'écouvillon avec du PBS 1X stérile :
  - Placer l'écouvillon dans un tube 1.5 ml et couper la tige de l'écouvillon.
  - Ajouter 1 ml de PBS 1X stérile.
  - Fermer le tube et vortexer 5 secondes à 2 reprises puis centrifuger rapidement.
  - Enlever l'écouvillon en le pressant sur les parois pour minimiser les pertes de volume.

- L'extraction sera réalisée à partir de **200 µl de l'éluat** (ou 200 µl de PBS pour le NCS).

Le reste de l'éluat devra être conservé à 4°C temporairement (4h), au-delà il devra être conservé à -20°C jusqu'à une prochaine extraction si nécessaire.

#### A partir d'échantillons liquides

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon (vortexer 5 secondes à 2 reprises puis centrifuger rapidement) : prélever **200 µl** comme prise d'essai et procéder au protocole d'extraction.

#### A partir d'organes

- Prélever **20-30 mg d'organe** (balance de précision), à déposer sur une boîte de Pétri stérile.
- Hacher finement les 20-30 mg avec scalpel/pince stériles.
- Transférer dans un tube contenant **250 µl de tampon PBS stérile** puis vortexer 1 minute.

Conservé la suspension à 4°C temporairement (4h) sinon à -20°C et procéder de la même façon pour le reliquat d'organe.

- Procéder à l'extraction à l'aide des kits BioExtract® Column, BioExtract® SuperBall® ou QIAamp® DNA mini kit, à partir de **200 µl d'organe dilacéré re-suspendu**.

## Extraction sur colonnes

### Kit BioExtract® Column (BioSella)

Cat. N° BEC050 ou BEC250

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

#### 1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

**Sous PSM**, dans un tube de 1.5 ml :

Ajouter **20 µl de Protéinase K**

Ajouter **180 µl de tampon ATL** et **1 µl carrier RNA**

Ajouter **200 µl d'échantillon** (ex : éluat écouvillonnaire ou PBS pour le contrôle négatif) préalablement vortexé.

**Vortexer 2 x 5 secondes** et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

**Incuber 30 min à 70°C.**

Cette étape permet la lyse des cellules dont les bactéries et conduit à l'inactivation des *Coxiella* potentiellement présentes dans l'échantillon. **A partir de cette étape on peut donc travailler hors PSM.**

Centrifuger brièvement puis ajouter **350 µl de Buffer LB.**

Vortexer puis centrifuger brièvement.

#### 2. Adsorption sur la membrane de silice

**Transférer délicatement 400 µl de lysat** sur la colonne BioExtract® Mini Spin Column (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).

**Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min.**

**Déposer le reliquat de lysat** (environ 350 µl) et **reproduire l'étape précédente.**

Changer de tube collecteur (Mettre la colonne BioExtract® dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

#### 3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter **600 µl de Buffer W1.**

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min.** Changer de tube collecteur.

Ajouter **600 µl de Buffer W2.**

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min.** Changer de tube collecteur.

Centrifuger à **20 000 x g pendant 2 min** pour sécher la membrane.

#### 4. Elution des acides nucléiques

Mettre la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un **nouveau tube de 1.5 ml**, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter **200 µl de Buffer EL** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.

**Incuber à température ambiante** (15–25°C) pendant **1 min.**

Centrifuger à **20 000 x g pendant 1 min.**

Conserver l'éluat contenu dans le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

L'ADN extrait peut être **conservé à 4°C si la qPCR est lancée dans la journée, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C.**

#### 4) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied BioSystems) en mode Standard et confirmé sur AriaMx™ (Agilent Technologies) (mode Fast par défaut) et ABI PRISM® 7500 Fast en mode Fast. Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre Support Technique.

	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
<b>Mode</b>	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
<b>Ramping</b>	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Fast par défaut
<b>Référence passive</b>	<b>ROX</b>	<b>ROX</b>

Tableau 8. Paramètres de réglage du thermocycleur

Cible	Détecteurs		Volume final/ puits
	Reporter	Quencher	
<b>C. burnetii</b>	FAM	NFQ-MGB ou None*	<b>20 µl</b> = 15 µl MM + 5 µl ADN extrait ou contrôles†
<b>C. abortus</b>	VIC	NFQ-MGB ou None*	
<b>IPC</b>	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

\* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSella (tech@biosella.com).

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite) et EPC (ADN cible *C. burnetii* et ADN cible *C. abortus*).

Tableau 9. Paramétrage du Programme d'amplification

Programme d'amplification Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	15 s	95°C
	30 s * + acquisition des données	60°C

\* Régler sur 31 secondes pour certains thermocycleurs tels que l'ABI PRISM® 7500.

Notes : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des Bio-T kit® à l'exception des kits de la gamme PIG.

La réalisation d'une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR pour l'amplification des génomes à ARN n'a pas d'incidence sur l'efficacité du Bio-T kit® *Coxiella burnetii* & *Chlamydia abortus* (données présentées dans le dossier de validation disponible sur demande).

3) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au « MIX »

- Après décongélation, vortex et rapide centrifugation, transférer 15 µl de Master Mix MMFQCHAB-A (tube bouchon blanc) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).















Dans la zone dédiée à l'ajout d'acides nucléiques

- Ajouter 5 µl d'ADN extrait (ou NCS ou eau ou EPC : tube EPCFQCHAB-A bouchon orange) par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, dans le Master Mix et en évitant de faire des bulles.
- Filmer la plaque avec le film ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

- Paramétrer le thermocycleur (voir § Paramètres de réglage du thermocycleur, Tableaux 8-9).
- Il est recommandé de centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles.
- Démarrer le programme (voir Tableau 9). Durée de run approximative de 65 min.

Figure 1. Extraction avec le kit BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250, BioSella)

<p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p>	 <p>Sous PSM</p>	<p>20 µl de Protéinase K 180 µl de Tampon ATL 200 µl d'échantillon (éluat écouvillonnaire)</p> <p>Vortex + Centrifugation rapide Incubation 30 min 70°C Re-centrifugation rapide</p> <p>350 µl de Buffer LB Vortex + Centrifugation rapide</p>												
<p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p>		<p>Charger délicatement la colonne BioExtract® Mini Spin Column</p> <p>6 000 x g 1 min</p>												
<p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p>		<table border="0"> <tr> <td>1<sup>er</sup> Lavage</td> <td>600 µl W1</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>2<sup>nd</sup> Lavage</td> <td>600 µl W2</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td></td> <td>20 000 x g 2 min</td> </tr> </table>	1 <sup>er</sup> Lavage	600 µl W1		6 000 x g 1 min	2 <sup>nd</sup> Lavage	600 µl W2		6 000 x g 1 min	-	-		20 000 x g 2 min
1 <sup>er</sup> Lavage	600 µl W1		6 000 x g 1 min											
2 <sup>nd</sup> Lavage	600 µl W2		6 000 x g 1 min											
-	-		20 000 x g 2 min											
<p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p>		<p>200 µl de Buffer EL (à Température Ambiante TA) délicatement</p> <p>TA 1 min</p> <p> 20 000 x g 1 min</p>												

## QIAamp® DNA mini kit (Qiagen) Cat. N° 51304

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

### 1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

**Sous PSM**, dans un tube de 1.5 ml :

Ajouter **20 µl de Protéinase K**

Ajouter **180 µl de tampon ATL**

Ajouter **200 µl d'échantillon** (ex : éluat écouvillonnaire ou PBS pour le contrôle négatif) préalablement vortexé.

**Vortexer 2 x 5 secondes** et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

**Incuber 30 min à 70°C.**

Cette étape permet la lyse des cellules dont les bactéries et conduit à l'inactivation des *Coxiella* potentiellement présentes dans l'échantillon.

**A partir de cette étape on peut donc travailler hors PSM.**

Centrifuger brièvement puis ajouter **200 µl de Buffer AL**.

Vortexer puis centrifuger brièvement.

**Incuber 10 min à 70°C.**

Centrifuger brièvement.

Ajouter **200 µl d'éthanol 100%**

Vortexer puis centrifuger brièvement.

### 2. Adsorption sur la membrane de silice

**Transférer délicatement 400 µl de lysat** sur la colonne QIAamp® (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).

**Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min.**

**Déposer le reliquat de lysat** (environ 400 µl) et **reproduire l'étape précédente.**

Changer de tube collecteur (Mettre la colonne dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

### 3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter **500 µl de Buffer AW1.**

Centrifuger à **6 000 x g** pendant 1 min. Changer de tube collecteur.

Ajouter **500 µl de Buffer AW2.**

Centrifuger à **20 000 x g** pendant 3 min. Changer de tube collecteur.

Centrifuger à **20 000 x g** pendant 1 min pour sécher la membrane.

### 4. Elution des acides nucléiques

Mettre la colonne QIAamp® dans un **nouveau tube de 1.5 ml**, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter **200 µl de Buffer AE** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.

**Incuber à température ambiante** (15–25°C) pendant 1 min.

Centrifuger à **6 000 x g** pendant 1 min.

Conserver l'éluat contenu dans le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

L'ADN extrait peut être **conservé à 4°C si la qPCR est lancée dans la journée, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C.**

L'établissement de la droite de calibration permet de relier les valeurs de Ct obtenues pour les extraits d'échantillons analysés à la quantité de *C. burnetii* exprimée en copies de génome équivalent (GE) / écouvillon (assimilé à 1ml).

NB : Pour la détection *C. abortus*, seule la valeur de Ct lue pour le point « EPC non dilué » doit être considérée pour validation de sa conformité par rapport à la valeur indiquée dans le CA.

### Choix 2 : Quantification relative

Cette approche nécessite d'extraire en parallèle des échantillons d'intérêt un **matériau de référence titré (MRSI)**, avec une méthode validée. Cet échantillon titré doit être produit à partir du MR Bactérien dosé fourni par le LNR-FQ, à diluer dans du PBS ou une matrice écouvillonnaire négative pour *C. burnetii*.

La procédure de préparation du **MRSI à 10<sup>4</sup> GE/ml** est présentée en Annexe 5 du dossier de validation du kit, disponible sur demande.

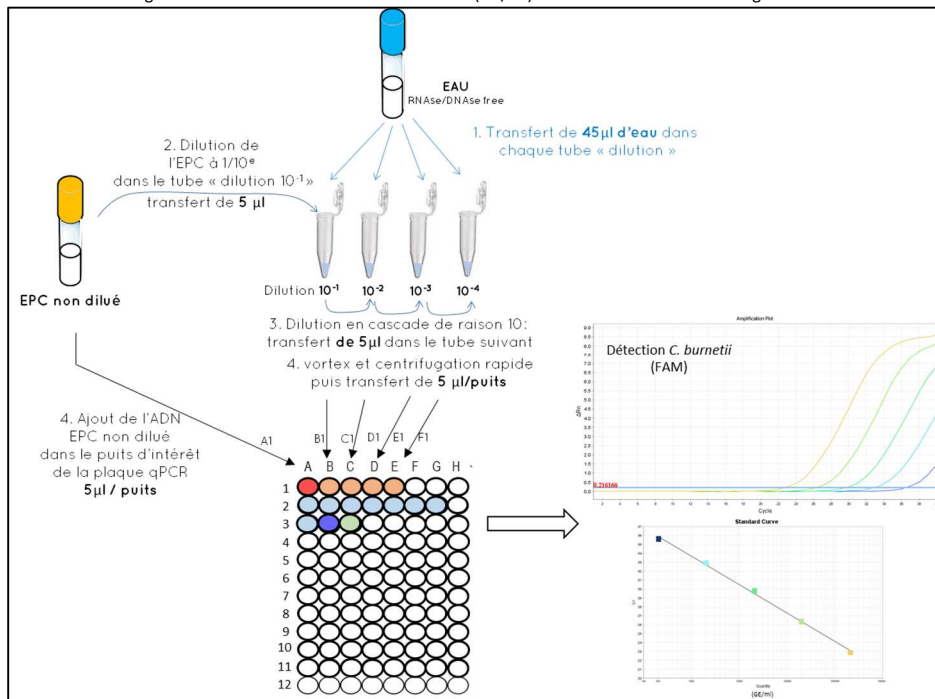
La comparaison entre les valeurs de Ct obtenues pour les échantillons et pour celle du MRSI permet de déduire la quantité relative de *C. burnetii* présente dans l'échantillon (voir Tableau 16).

**Procédure de dilution de l'EPC en vue d'une quantification absolue**

⚠ **ATTENTION : risque de contamination**

- Il faut réaliser **4 dilutions en cascade, chacune au 1/10<sup>e</sup>** (ex : 5 µl dans 45 µl d'eau (tube bouchon **bleu**) ou TE 1X), en utilisant le tube d'EPC non dilué (bouchon **orange**) comme tube de départ. Les dilutions doivent être préparées de façon extemporanée à partir du tube EPC fourni.
- Prendre soin de **vortexer et centrifuger rapidement chaque tube, entre chaque dilution.**
- **5 µl de chaque dilution** (voir Tableau 7) seront **utilisés pour la qPCR**, selon le plan de plaque défini. La Figure 4 schématise la procédure de dilutions de l'EPC en vue d'une quantification absolue.

**Figure 4. Schéma de la procédure à suivre pour la préparation de l'EPC en vue d'une quantification absolue.** Les 5 charges d'EPC produites sont utilisées en quantification absolue pour obtenir une droite de calibration reliant les valeurs de Ct en logarithme de la concentration de *C. burnetii* (GE/ml) comme montré dans cette figure.



La pente « a » de la droite de calibration (cible *C. burnetii*) permet de déterminer l'efficacité E de la PCR en %. **L'efficacité moyenne acceptable doit être comprise entre 85 et 115%.**

**Figure 2. Extraction avec le kit QIAamp® DNA mini kit (Cat. N° 51304, Qiagen)**

<p><b>1</b></p> <p><b>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</b></p>	<p><b>Sous PSM</b></p> <p>20 µl de Protéinase K 180 µl de Tampon ATL 200 µl d'échantillon (éluat écouvillonnaire)</p> <p>Vortex + Centrifugation rapide Incubation 30 min 70°C re-centrifugation rapide</p> <p>200 µl de Tampon AL Vortex + Centrifugation rapide Incubation 10 min 70°C</p> <p>200 µl d'éthanol 100% Vortex + Centrifugation rapide</p>
<p><b>2</b></p> <p><b>Adsorption sur la membrane de silice</b></p>	<p><b>Charger délicatement la colonne QIAamp® Mini Column</b></p> <p>6 000 x g 1 min</p>
<p><b>3</b></p> <p><b>Lavages</b></p> <p><b>Séchage de la membrane de silice</b></p>	<p><b>1<sup>er</sup> Lavage</b>      500 µl AW1      6 000 x g 1 min</p> <p><b>2<sup>nd</sup> Lavage</b>      500 µl AW2      20 000 x g 3 min</p> <p><b>Séchage</b>              -                      20 000 x g 1 min</p>
<p><b>4</b></p> <p><b>Elution des acides nucléiques</b></p>	<p>200 µl de Buffer AE (à Température Ambiante -TA-)</p> <p>TA 1 min</p> <p>6 000 x g 1 min</p>

## Extraction avec billes magnétiques

### Kit BioExtract® SuperBall® (BioSella)

Cat. N° BES384

Pour utilisation avec KingFisher™ Flex, Duo ou mL

*Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions*

#### 1. Lyse cellulaire

**Sous PSM**, dans un tube de 1.5 ml, ajouter :

**20 µl de protéinase K**

**180 µl de tampon ATL**

**200 µl d'échantillon** (ex : éluat écouvillonnaire ou PBS pour le contrôle négatif) préalablement vortexé.

**Vortexer 2 x 5 secondes** et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

**Incuber 30 min à 70°C.**

Cette étape permet la lyse des cellules dont les bactéries et conduit à l'inactivation des *Coxiella* potentiellement présentes dans l'échantillon. **A partir de cette étape on peut donc travailler hors PSM.**

#### 2. Préparation des plaques ou barrettes

**Préparer les consommables** pour la série d'extraction :

**Flex** : 4 plaques Deep-wells et 2 microplaques. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter (voir Tableau 6).

**Duo** : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'éluion.

**mL** : 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

**Préparer la solution LB-SMB-carrier** comme indiqué ci-dessous :

Tableau 5. Solution de lyse LB-SMB-carrier							
Réactif	Nombre d'échantillons*						
	1	5	10	12	15	48	96
Buffer LB	400 µl	2.2 ml	4.4 ml	5.28 ml	6.6 ml	21.12 ml	42.24 ml
SMB (SuperBall Magnetic Beads)‡	25 µl	137.5 µl	275 µl	330 µl	412.5 µl	1.32 ml	2.64 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	5.5 µl	11 µl	13.2 µl	16.5 µl	52.8 µl	105.6 µl

\* Pour compenser les erreurs de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis. Le volume de tampon en excès peut être conservé en vue d'une utilisation sous 8 jours ; au-delà de cette durée, il doit être jeté.

‡ Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes avant la première utilisation ou 1 minute pour les utilisations suivantes.

Au fond des puits de la « Deep-well Lysat » (Flex), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL), **transférer** :

**400 µl de lysat** après avoir vortexé le tube et centrifugé rapidement (centrifugeuse de paillasse).

**400 µl de solution de lyse LB-SMB-carrier** préalablement vortexée vigoureusement (30 sec).

**2) Pour la détection de *C. burnetii*** : choisir la **méthode de quantification** (pour les prélèvements de type écouvillons)

La quantification de *C. burnetii* peut se faire :

- en **quantification absolue** à l'aide de l'EPC titré qui a été raccordé au Matériau de Référence (MR) ADN fourni par le LNR-FQ, exprimé en GE/ml (plus d'information dans le dossier de validation du kit).
- en **quantification relative** en comparant la valeur de Ct obtenue pour l'échantillon à la valeur de Ct obtenue pour le MRSI 10<sup>4</sup> GE/ml (voir § Interprétation des résultats).

#### Choix 1 : Quantification absolue

L'EPC (bouchon **orange**), raccordé au MR ADN fourni par le LNR-FQ, est fourni à la concentration de 2.10<sup>6</sup> GE/ml. Il doit être dilué comme indiqué ci-après (voir § *Procédure de dilution de l'EPC* et Figure 4) pour produire **une gamme étalon** de raison 10 **comprenant 5 points** de concentration décroissante de 2.10<sup>6</sup> à 2.10<sup>2</sup> GE/ml comme indiqué dans le Tableau 7. **La concentration la plus faible (2.10<sup>2</sup> GE/ml) correspond à la LQ<sub>PCR</sub> et la LD<sub>PCR</sub>.**

Les 5 puits correspondants aux 5 points de gamme devront être qualifiés comme « standard » lors du paramétrage du logiciel du thermocycleur, et leur attribuer une valeur de concentration en *C. burnetii* (GE)/ml.

Pour les protocoles BioExtract® Column et SuperBall®, les concentrations sont imputées d'un facteur correctif déterminé lors de la validation des méthodes. L'utilisation du kit QIAamp® DNA mini kit ne nécessite pas de facteur correctif.

Tableau 7. Relation entre le niveau de dilution de l'EPC et concentration en GE / ml					
Concentration <i>C. burnetii</i> (GE/ml)	Facteur de dilution de l'EPC				
	Non dilué	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Par défaut*	2.10 <sup>6</sup>	2.10 <sup>5</sup>	2.10 <sup>4</sup>	2.10 <sup>3</sup>	2.10 <sup>2</sup>
Pour BioExtract® Column	8,72 .10 <sup>6</sup>	8,72 .10 <sup>5</sup>	8,72 .10 <sup>4</sup>	8,72 .10 <sup>3</sup>	8,72 .10 <sup>2</sup>
Pour BioExtract® SuperBall®	6,78 .10 <sup>6</sup>	6,78 .10 <sup>5</sup>	6,78 .10 <sup>4</sup>	6,78 .10 <sup>3</sup>	6,78 .10 <sup>2</sup>

\* Concentration à considérer pour l'utilisation du kit QIAamp® DNA mini kit.

## DETECTION de *Coxiella burnetii* & *Chlamydia abortus* par qPCR avec le BioTK039

### Procédure globale à suivre

- 1) **Etablir un plan de plaque** définissant la position de chaque échantillon et **incluant les contrôles** décrits ci-dessous:
  - **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction.  
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction et sera positionné en fin de série, tous les 7 à 10 extraits environ selon les risques d'inter-contamination identifiés par le laboratoire.
  - **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait ADN au moment du dépôt sur plaque qPCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.  
Ce contrôle est recommandé lors de la 1<sup>ère</sup> utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
  - **Contrôle positif de processus pour la cible *C. burnetii*** : Il s'agit d'ADN extrait à partir d'un échantillon contenant une quantité connue de *Coxiella burnetii*.  
Comme présenté dans le Tableau 1 et le § *Extraction ADN/ Préparation des échantillons*, ce contrôle est constitué par le MRSI à une concentration de 10<sup>4</sup> GE/ml (analyse individuelle) ou 10<sup>3</sup> GE/ml (analyse de mélanges) en quantification relative ou un MRI.  
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction, il permet de valider l'ensemble du processus, grâce à une carte de contrôle.
  - **Contrôle positif d'amplification de *C. burnetii* et *C. abortus* (tube EPCFQCHAB-A, bouchon orange)** : il s'agit d'un mélange d'ADN synthétiques comprenant la séquence cible de *C. burnetii*, titré en GE/ml, et la séquence cible de *C. abortus*. Ce contrôle sera sous forme :
    - d'un point unique dans le cadre d'une analyse qualitative (*C. abortus* et *C. burnetii*) ou quantitative relative (*C. burnetii*),
    - d'une gamme étalon dans le cadre d'une analyse quantitative absolue (détection *C. burnetii*). Dans ce cas, la valeur de Ct obtenue pour la cible *C. abortus* pour le premier point de cette gamme (EPC non dilué) sera utilisée comme valeur de conformité pour la détection de *C. abortus* en analyse qualitative.
 Ce contrôle est obligatoire.

Pour les contrôles positifs de processus et d'amplification, un signal positif doit obligatoirement être détecté pour chaque cible, avec une valeur de Ct située dans l'intervalle de tolérance indiqué dans le certificat d'analyse (CA) pour l'utilisation de l'EPC (cible *C. burnetii* et cible *C. abortus*) ou en accord avec les valeurs de la carte de contrôle (MRI, MRSI) pour le cas de la détection *C. burnetii*.

⚠ **ATTENTION** : La manipulation de ce tube représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur plaque.

Distribuer les autres réactifs, en suivant les indications présentées dans le Tableau 6 ci-après.

A faire extemporanément ou à fermer pour éviter toute évaporation ou contamination.

Tableau 6. Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, Duo et mL				
Position sur la barrette ou la plaque			Élément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex	Duo*	mL		
Deep-well Lysat	Ligne A	Position A	Lysat†	800†
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Buffer W1	700
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Buffer W2	700
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Ethanol (96–100%)	750
Microplaque Elution	Elution strip	Position E	Buffer EL	200
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	A positionner manuellement	Peigne	—

\* Les lignes C, D et H sont vides.

† Inclut 400 µl d'échantillon prétraité et 400 µl de solution LB-SMB-carrier.

### 3. Lancement du KingFisher™


















Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « **BioExtract\_KF\_Flex** », « **BioExtract\_KF\_Duo** » ou « **BioExtract\_KF\_mL** » et démarrer.

En fin de programme, récupérer les éluats (microplaque Elution pour KingFisher™ 96/Flex, Elution strip pour KingFisher™ Duo ou puits E pour KingFisher™ mL).

L'ADN extrait (plaque ou puits fermé ou microtube) peut être **conservé à 4°C si la qPCR est lancée dans la journée, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C.**



Figure 3. Extraction d'ADN avec le kit BioExtract® SuperBall®  
(Cat. N° BES384, BioSella)

	KingFisher™ Flex	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Élément à ajouter
<b>1</b> <b>Lyse</b> <b>Sous PSM</b>	Dans tube 1.5 ml stérile			200 µl d'échantillon + 20 µl Protéinase K + 180 µl de Tampon ATL Incubation 30min à 70°C
<b>2</b> <b>Préparation</b> <b>des plaques</b> <b>ou barrettes</b>	Deep-well Lysat 	Ligne A 	Position A 	400 µl de Lysat + 400 µl de solution LB-SMB-carrier (Pour 1 : 400 µl Buffer LB + 25 µl SMB + 1 µl carrier RNA)
	Deep-well Wash 1 	Ligne E 	Position B 	700 µl de Buffer W1
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	700 µl de Buffer W2
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	750 µl d'éthanol (96-100%)
	microplaque Elution 	Elution strip 	Position E 	200 µl de Buffer EL
	microplaque Peigne 	Ligne B   (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement	Peigne (Rod Cover)
<b>2</b> <b>KingFisher™</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allumer le KingFisher™ Flex, Duo ou mL.</li> <li>• Ouvrir la porte du couvercle protecteur.</li> <li>• Sélectionner le programme BioExtract® SuperBall® souhaité à l'aide des touches fléchées.</li> <li>• Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil.</li> </ul>			

Pour avoir le programme KingFisher™ adéquat selon la version de l'automate, veuillez contacter notre Support Technique ([tech@biosellal.com](mailto:tech@biosellal.com)).