

Méthode d'analyse en Santé Animale

RÉFÉRENCE : ANSES/DOZ/INS/0168 - Version 00

Avril 2017

Détection de *Taylorella equigenitalis* par PCR temps réel à partir de prélèvements génitaux d'équidés et de souches bactériennes

Laboratoire de pathologie équine de Dozulé
Laboratoire national de référence métrite contagieuse équine



**European Union Reference
Laboratory for Equine Diseases
other than African Horse Sickness**



Historique de la méthode

Une méthode peut être mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est considérée comme majeure dès lors qu'elle concerne des parties clés ou le fond même de la méthode, dont la prise en compte est susceptible d'améliorer significativement la portée ou le résultat de la méthode d'analyse. Une modification majeure induit en général des adaptations importantes. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation.

Une modification est considérée comme mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Les caractéristiques de performance de la méthode ainsi améliorée ne sont pas modifiées; elle n'a pas fait l'objet d'une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode.

Version	Nature des modifications	Date	Principales modifications
00*	/	28 avril 2017	Version initiale

* La version 00 a fait l'objet d'une consultation du public du 20 mars 2017 au 21 avril 2017 sur le site internet de l'Agence, notamment auprès des LNR et laboratoires agréés français.



Avant-propos

Anses - Laboratoire de pathologie équine de Dozulé

Laboratoire National de Référence métrite contagieuse équine

Unité Bactériologie

Adresse : RN 175 - 14430 Goustranville

Contact : Sandrine PETRY

La présente méthode a été rédigée par Fabien DUQUESNE (chargé de projet) et Sandrine PETRY (responsable du LNR MCE).



Sommaire

Avant-propos.....	3
Avertissements et précautions de sécurité	5
1 Objet et domaine d'application	6
2 Documents de référence	6
3 Termes, sigles et définitions	6
4 Principe de la méthode	7
5 Réactifs	8
5.1 Eau	8
5.2 Oligonucléotides.....	8
5.3 Autres réactifs.....	9
5.4 Sentinelle SE (matériau de référence interne)	9
6 Appareillage et matériels	10
7 Échantillons.....	11
7.1 Conditions d'acceptation des échantillons	11
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	11
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	11
8 Mode opératoire	12
8.1 Préparation des échantillons pour analyse	12
8.2 Préparation et distribution du mélange réactionnel (mix PCR)	14
8.3 Addition des solutions d'ADN à tester et témoins	14
8.4 Amplification par PCR.....	14
9 Résultats.....	15
9.1 Contrôle de la validité et analyse des résultats.....	15
9.2 Expression des résultats	16
10 Caractéristiques de performance de la méthode	16



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.



1 Objet et domaine d'application

Le présent document décrit une méthode de mise en évidence de *Taylorella equigenitalis* par PCR en temps réel. Cette méthode s'applique à tous les prélèvements génitaux d'équidés susceptibles de contenir *Taylorella equigenitalis*, et notamment les écouvillons placés en milieu de transport Amies-charbon dans la cadre du règlement d'exécution (UE) N° 846/2014 [3]. Elle s'applique également aux souches bactériennes préalablement isolées de ces prélèvements génitaux d'équidés dans un contexte de confirmation d'un cas de MCE.

La méthode résulte de l'adaptation de la PCR en temps réel décrite dans la publication internationale de Wakeley *et al.* [4].

Les exigences générales relatives à l'assurance qualité et à la mise en œuvre d'une PCR dans le domaine de la santé animale sont décrites dans la norme AFNOR NF U47-600-1 [2].

2 Documents de référence

- [1] AFNOR Norme NF U47-108 (Décembre 2012). Isolement et identification de *Taylorella equigenitalis* à partir de prélèvements génitaux d'équidés. 1er tirage 2012-12-F.
- [2] AFNOR Norme NF U47-600-1 (Février 2015). Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale. Version de 2015-02-F.
- [3] RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) No 846/2014 DE LA COMMISSION du 4 août 2014 modifiant l'annexe D de la directive 92/65/CEE du Conseil en ce qui concerne les conditions applicables aux animaux donneurs de l'espèce équine.
- [4] Wakeley, P.R., Errington, J., Hannon, S., Roest, H.I.J., Carson, T., Hunt, B., Sawyer, J., Heath, P., 2006. Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*. Vet. Microbiol. 118, 247-254.
- [5] World Organisation for Animal Health, 2012. Chapter 2.5.2. Contagious Equine Metritis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.02_CEM.pdf.

3 Termes, sigles et définitions

ADN : acide désoxyribonucléique

Analyte : substance recherchée ou déterminée (synonyme de séquence d'ADN cible en PCR)

Ct : threshold cycle (cycle seuil en français)

MCE : métrite contagieuse équine



Mime : micro-organisme ou toute structure artificielle présentant des propriétés physico-chimiques similaires à celles de l'agent recherché

PSM : poste de sécurité microbiologique

SE : sentinelle. Il s'agit d'un matériau de référence interne produit par le laboratoire pour évaluer et vérifier la fidélité des analyses en l'absence de matériau de référence caractérisé. La SE est idéalement comprise entre 1 et 10 fois la limite de détection de la méthode (LD_{METHODE}) mais en pratique, elle peut être comprise entre 1 et 100 fois la LD_{METHODE} . La SE est ici utilisée pour réaliser les témoins positifs (PCR et processus) de la PCR cible.

Série d'analyse : ensemble d'échantillons pour lesquels le processus analytique est réalisé dans les mêmes conditions (temps, lieu, matériel et réactifs).

Témoin de PCR négatif ou positif : témoin de l'étape de PCR où le volume d'un lysat cellulaire à analyser est remplacé par de l'eau ultrapure nucléase-free (T_{PCR} négatif) ou par un lysat cellulaire contenant la séquence d'ADN cible en quantité détectable (T_{PCR} positif).

Témoin de processus négatif ou positif : témoin traité de la même manière qu'un échantillon lors de l'ensemble des étapes du processus analytique, non contaminé par l'organisme cible ($T_{\text{PROCESSUS}}$ négatif) ou contaminé par une quantité détectable d'organisme cible ($T_{\text{PROCESSUS}}$ positif).

Témoin positif non cible ou contrôle interne (CI) : témoin correspondant à une autre séquence d'ADN provenant d'un mime et amplifiée au cours de l'analyse pour vérifier le bon déroulement de tout ou partie du processus analytique ainsi que la présence ou non d'inhibiteur de PCR au sein des échantillons à analyser. Le mime est ici ajouté aux échantillons et aux témoins pour une détection dans le même tube de PCR que la cible.

UFC : unité formant colonie

4 Principe de la méthode

La détection de *Tylorella equigenitalis* par PCR repose sur la détection d'une séquence d'ADN cible spécifique de la bactérie d'intérêt provenant du prélèvement. L'ADN bactérien est libéré des cellules par chauffage (10 min à 95-100°C) d'une suspension cellulaire obtenue à partir des matrices à analyser de type écouvillon ou souche bactérienne. L'amplification de la séquence d'ADN cible, ici un fragment de l'ADN ribosomique 16S codant l'ARNr 16S, est ensuite réalisée par PCR en temps réel. La spécificité de la méthode est assurée par un couple d'amorces permettant l'amplification de la séquence d'ADN cible et par une sonde de type TaqMan® dont l'hydrolyse entraîne l'émission d'une fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'ADN cible présente dans le tube PCR. Bien que produisant une valeur de Ct chiffrée, il s'agit ici d'une méthode qualitative.



Tableau des différentes étapes du processus analytique :

PROCESSUS ANALYTIQUE	ECHANTILLON	Ecouvillon	Souche bactérienne
	Préparation	Agitation manuelle environ 5 s dans 0,2 ml d'eau ultrapure nucléase-free	1 colonie dans 1,0 ml d'eau ultrapure nucléase-free puis aliquot de 0,2 ml
		Ajout du mime contenant l'ADN non cible	
	Extraction	Lyse cellulaire (pathogène et mime) par chauffage	
	Préparation des réactifs et de la PCR	Préparation du Mix PCR cible / non cible	
		Distribution du Mix PCR	
		Addition des extraits d'ADN à analyser et des témoins PCR	
	Amplification	PCR	
	Post PCR	Analyse des signaux PCR	
		Expression des résultats	
		Rapport d'analyse	

5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Les recommandations des fournisseurs, concernant les conditions de stockage avant utilisation, seront respectées, ainsi que la conservation en cours d'utilisation. Le laboratoire doit dans tous les cas prendre en compte les dates de péremption préconisées par les fabricants lorsqu'une telle date est fournie.

5.1 Eau

L'utilisation d'une eau ultrapure nucléase-free (exempt de DNase et RNase) est recommandée. Il est tout de même possible d'utiliser une autre eau dont la qualité est adaptée aux applications de biologie moléculaire.

5.2 Oligonucléotides

Amorces ou sonde	Séquence (5'-3')	Concentration
Amorce Tay377for	CCGCGTGTGCGATTGA	10 µM
Amorce Tay488rev	TTTGCCGGTGCTTATTCTTGA	10 µM
Sonde TequiFAM	[6FAM]AAAGGTTTGTGTTAATACCATGGACTGCTGACGG[TAM]	10 µM

A réception les amorces et les sondes sont diluées dans de l'eau ultrapure nucléase-free à la concentration attendue (travailler en condition stérile ; les micropipettes doivent être munies de pointes à filtre) puis aliquotées pour un nombre limité d'utilisations afin de limiter les cycles de



congélation/décongélation. Il est important que cette étape soit physiquement découplée des analyses PCR afin d'éviter la contamination des oligonucléotides.

Les sondes marquées avec les fluorophores FAM pour la détection de la séquence d'ADN cible et Cy5 (ou Quasar670) pour la détection de la séquence d'ADN non cible sont conservées à l'obscurité et manipulées en évitant une trop longue et trop intense exposition à la lumière (risque de photolyse). D'autres fluorophores rapporteurs compatibles avec le thermocycleur peuvent être utilisés sous réserve que le fluorophore extincteur soit adapté.

5.3 Autres réactifs

Nom	Fabricant	Référence
SensiFAST™ Probe No-ROX Kit ^a	Bioline	BIO-86005 / 500 réactions de 20 µl BIO-86020 / 2000 réactions de 20 µl
^a Existe également avec ROX : SensiFAST™ Probe Lo-ROX Kit (Références BIO-84005 et BIO-84020) et SensiFAST™ Probe Hi-ROX Kit (Références BIO-82005 et BIO-82020).		
DNA Extraction Control 670 ^{b,c}	Bioline	BIO-35028 / 500 réactions BIO-35029 / 2000 réactions
^b Composé de : i. mime correspondant à des cellules viables d' <i>Escherichia coli</i> contenant l'ADN non cible (génotype : F- <i>deoR endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17(rk-, mk+) supE44 thi-1 phoA Δ(lacZYA-argF)U169Φ80lacZΔ15λ-pBR322 (ranseqb1 AmpR)</i>), nommé « Internal Control » par le fournisseur du kit ; ii. mix d'oligonucléotides non cible prêt à l'emploi : amorces et sonde, nommé « 25x Control Mix » par le fournisseur du kit.		
^c l'acquisition du signal fluorescent du DNA Extraction Control 670 se fait sur le canal d'émission 670 nm (Cy5 ou Quasar670)		

5.4 Sentinelle SE (matériau de référence interne)

En absence de matériau de référence caractérisé, une SE, produite selon l'annexe B paragraphe B.3 de la norme AFNOR NF U47-600-1 [2], est utilisée pour la réalisation des T_{PCR} et T_{PROCESSUS} positifs. Il est important que sa production soit physiquement découplée des analyses PCR afin d'éviter la contamination des échantillons à analyser.

Le mode opératoire ci-dessous est présenté à titre d'exemple ; il permet d'obtenir une SE comprise entre 1 et 10 LD_{METHODE} mais dans la pratique la SE peut être comprise entre 1 et 100 LD_{METHODE} en fonction de la complexité de la matrice.

Remarque. L'adoption de la méthode selon la norme AFNOR NF U47-600-1 a normalement permis de définir la dilution SE ; néanmoins il peut être utile de reconfirmer celle-ci avant de réaliser le mode opératoire ci-dessous.

1. En condition stérile, réaliser en PBS pH 7,4 ou en eau physiologique (solution de NaCl à 0,85%) des dilutions sérieées de raison 10 à partir d'une colonie d'une souche de *Taylorella equigenitalis* convenablement identifiée jusqu'à obtenir la dilution SE 1/10^e.
2. Valider la SE par PCR :



- i. prendre 8 écouvillons stériles et les plonger environ 5 s dans la dilution SE en les agitant légèrement manuellement puis les essorer le long de la paroi du tube ; placer les écouvillons dans leur gaine respective de milieu Amies-charbon.
 - ii. refaire l'étape i. avec la dilution SE 1/10^e.
 - iii. analyser les 16 écouvillons comme des écouvillons de terrain selon la présente méthode ANSES/DOZ/INS/0168 en deux séances de PCR à raison de 4 écouvillons par dilution (4 SE et 4 SE 1/10^e) et par séance.
3. La quantité d'analyte contenue dans la SE peut être évaluée par comptage bactérien sur milieu solide (gélose chocolat sans inhibiteur adaptée à la croissance de *Taylorella equigenitalis* – composition proposée dans la norme NF U47-108) avant et/ou après la réalisation des écouvillons (en cas de comptage après écouvillonnage, penser à préparer des écouvillons supplémentaires pour réaliser le comptage).

La SE ainsi produite est conforme si la dilution SE 1/10^e montre moins de 100% de réponse positive contrairement à la dilution SE (dans ce cas la quantité d'analyte présente dans la SE est au maximum de 10 LD_{METHODE}). En cas de conformité, la SE est aliquotée en doses uniques de 0,2 ml conservées à température ≤ -16°C.

6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnés dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifie nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Thermocycleur PCR temps réel et ordinateur de pilotage capables d'exciter et de mesurer la fluorescence des fluorophores « FAM » et « Cy5 ». Le protocole a été évalué sur les thermocycleurs LightCycler® 480 II (Roche) et C1000 Touch™ CFX96™ (BioRad).

Congélateur à température ≤ -16°C

Enceinte réfrigérée (5±3)°C

Hotte(s) PCR et/ou PSM(s) dédiés aux différentes étapes du processus en fonction du schéma d'organisation d'utilisation des locaux mis en place selon les recommandations de la norme NF U47-600-1

Bac rempli de glace pilée (ou portoir réfrigéré) pour conserver les réactifs et le mélange réactionnel durant l'analyse

Système de distribution de type micropipettes

Matériels à usage unique :

- Ecouvillons Amies-charbon stérile pour préparer les T_{PROCESSUS} (négatif et positif)



- Pointes à filtre stériles de volume adapté aux micropipettes
- Microtubes DNase-free de volume adapté (1,5 ml, 2 ml voire 5 ml pour la réalisation du mélange réactionnel)
- Tubes ou plaques PCR adaptés à la PCR en temps réel (compatibles avec le ou les thermocycleurs utilisés)
- Capuchons plats pour tubes PCR ou films pour plaques PCR adaptés à la PCR temps réel

7 Échantillons

7.1 Conditions d'acceptation des échantillons

Les échantillons à analyser sont le plus souvent des écouvillons génitaux d'équidés placés en milieu de transport Amies-charbon (analyse de première intention). Ils doivent être convenablement bouchés et expédiés au laboratoire à l'abri de la lumière. Dans le cadre des échanges et importations dans l'Union Européenne, le règlement d'exécution (UE) N° 846/2014 [3] précise que i) les écouvillons doivent être placés en milieu de transport Amies-charbon avant d'être envoyés au laboratoire et ii) la méthode PCR doit être mise en œuvre dans un délai de 48 heures suivant le prélèvement des échantillons.

Les échantillons peuvent également être des souches bactériennes préalablement isolées de prélèvements génitaux d'équidés selon la norme AFNOR NF U47-108 [1] ou selon les recommandations du manuel terrestre de l'OIE chapitre 2.5.2. [5] lorsque l'analyse de première intention a été réalisée hors de France (analyse de seconde intention). Le mode de transport et le conditionnement de la souche bactérienne durant celui-ci doivent permettre la revivification de la souche à réception. Il est recommandé à l'expéditeur de conserver la souche bactérienne par congélation, surgélation ou lyophilisation comme sauvegarde en cas de sa non revivification à réception.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Les échantillons sont généralement pris en charge dès réception. Néanmoins, en cas de besoin, ils peuvent être stockés en enceinte réfrigérée (5 ± 3)°C avant analyse.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Après l'étape de préparation des échantillons (paragraphe 8.1.), ceux-ci sont conservés en enceinte réfrigérée (5 ± 3)°C jusqu'à l'envoi du rapport d'analyse. Ils peuvent ensuite être éliminés ou conservés à température ≤ -16 °C pour les écouvillons et à température ≤ -16 °C ou ≤ -65 °C (voire lyophilisés) pour les souches bactériennes.



8 Mode opératoire

Les exigences générales relatives à l'assurance qualité et à la mise en œuvre de l'analyse sont décrites dans la norme AFNOR NF U47-600-1 [2].

Mettre des gants et les changer régulièrement. Privilégier dès que possible le matériel à usage unique.

Les réactifs et le mélange réactionnel sont maintenus au froid durant l'analyse à l'aide d'un bac rempli de glace pilée (ou d'un portoir réfrigéré).

8.1 Préparation des échantillons pour analyse

La préparation des échantillons se réalise sous PSM. Chaque échantillon est traité individuellement.

Matrice écouvillon (analyse de première intention)

1. Dans des tubes de 1,5 ml DNase-free, préparer autant d'aliqots de 0,2 ml d'eau ultrapure nucléase-free que d'échantillons à analyser plus un pour le $T_{\text{PROCESSUS}}$ négatif.
2. Echantillon(s) : enlever l'écouvillon de sa gaine et le plonger environ 5 s dans un aliqot de 0,2 ml d'eau ultrapure nuclease-free préparé à l'étape 1 en l'agitant légèrement manuellement puis l'essorer le long de la paroi du tube. Après avoir replacé l'écouvillon dans sa gaine, ajouter le mime aux 0,2 ml selon les recommandations du fournisseur (5 μ l pour le kit DNA Extraction Control 670). Répéter cette étape autant de fois que d'échantillons à analyser.
3. T_{PCR} positif (à réaliser en un exemplaire pour chaque série d'analyse) : ajouter le mime selon les recommandations du fournisseur (5 μ l pour le kit DNA Extraction Control 670) dans un aliqot de 0,2 ml de SE préalablement décongelé.
4. $T_{\text{PROCESSUS}}$ positif (à réaliser en un exemplaire pour chaque série d'analyse) :
 - i. prendre un écouvillon stérile et le plonger environ 5 s dans un aliqot de 0,2 ml de SE préalablement décongelé en l'agitant légèrement manuellement puis l'essorer le long de la paroi du tube ; placer l'écouvillon dans sa gaine de milieu Amies-charbon.
 - ii. suivre l'étape 2.
5. $T_{\text{PROCESSUS}}$ négatif (à réaliser en un exemplaire pour chaque série d'analyse) :
 - i. Placer l'écouvillon stérile dans sa gaine de milieu Amies-charbon ;
 - ii. Enlever l'échantillon de sa gaine et le plonger environ 5 s dans un aliqot de 0,2 ml d'eau ultrapure nucléase-free préparé à l'étape 1 puis l'essorer le long de la paroi du tube ; replacer l'écouvillon dans sa gaine de milieu Amies-charbon.
 - iii. suivre l'étape 2.
6. Chauffer l'ensemble des tubes (échantillon(s) et témoins) 10 min à 95-100°C puis les placer dans un bac de glace (ou portoir réfrigéré) afin d'obtenir des lysats cellulaires qui



seront utilisés immédiatement ou conservés à température $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Après analyse, ceux-ci sont conservés à température $\leq -16^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'envoi du rapport d'analyse.

Matrice souche bactérienne (analyse de seconde intention – confirmation)

Dans ce cas particulier où l'analyte est en excès il n'y a pas d'intérêt que le témoin positif cible soit en limite de détection. En conséquence, et afin de suivre le processus analytique, le $T_{\text{PROCESSUS}}$ positif ne sera pas réalisé à partir de la SE mais directement à partir d'une colonie d'une souche de *Taylorella equigenitalis* convenablement identifiée (par exemple celle ayant servi à produire la SE).

1. Repiquer la ou les souches bactériennes à analyser ainsi qu'une souche de *Taylorella equigenitalis* convenablement identifiée sur une gélose chocolat (composition définie dans la norme NF U47-108) et incubé le tout à 37°C sous 5-10% de CO_2 (condition de croissance définie dans la norme NF U47-108) jusqu'à l'obtention de colonies isolées d'environ 1-2 mm de diamètre (environ 48 h pour *Taylorella equigenitalis*).
2. Dans des tubes de 1,5 ml DNase-free,
 - i. préparer autant d'aliqots de 1,0 ml d'eau ultrapure nucléase-free que de souches bactériennes à analyser plus un pour le $T_{\text{PROCESSUS}}$ positif ;
 - ii. préparer un aliqot de 0,2 ml d'eau ultrapure nucléase-free pour le $T_{\text{PROCESSUS}}$ négatif.
3. Echantillon(s) : piquer stérilement une colonie (par exemple à l'aide d'une pipette Pasteur) et la resuspendre dans l'un des aliqots de 1,0 ml d'eau ultrapure nucléase-free préparés à l'étape 2. Bien homogénéiser la suspension (par exemple par vortexage) avant d'en extraire un aliqot de 0,2 ml dans un tube de 1,5 ml DNase-free et d'y ajouter le mime selon les recommandations du fournisseur (5 μl pour le kit DNA Extraction Control 670). Répéter cette étape autant de fois que de souches bactériennes à analyser.
4. T_{PCR} positif (à réaliser en un exemplaire pour chaque série d'analyse) : ajouter le mime selon les recommandations du fournisseur (5 μl pour le kit DNA Extraction Control 670) dans un aliqot de 0,2 ml de SE préalablement décongelé.
5. $T_{\text{PROCESSUS}}$ positif (à réaliser en un exemplaire pour chaque série d'analyse) : réaliser l'étape 4 à partir de la souche de *Taylorella equigenitalis* repiquée lors de l'étape 1.
6. $T_{\text{PROCESSUS}}$ négatif (à réaliser en un exemplaire pour chaque série d'analyse) : ajouter le mime selon les recommandations du fournisseur (5 μl pour le kit DNA Extraction Control 670) dans l'aliqot de 0,2 ml d'eau ultrapure nucléase-free préparé à l'étape 2.
7. Chauffer l'ensemble des tubes (échantillon(s) et témoins) 10 min à $95-100^{\circ}\text{C}$ puis les placer dans un bac de glace (ou portoir réfrigéré) afin d'obtenir des lysats cellulaires qui seront utilisés immédiatement ou conservés à température $\leq -16^{\circ}\text{C}$. Après analyse, ceux-ci sont conservés à température $\leq -16^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'envoi du rapport d'analyse.



8.2 Préparation et distribution du mix PCR

Le volume final du mix PCR est à préparer en fonction du nombre d'échantillons à tester, additionné des témoins dont le nombre et la répartition doivent être adaptés par série d'analyse.

La composition du mix PCR est la suivante :

Réactif	Volume en µl pour 1 réaction de PCR
Mix SensiFAST™ Probe Kit (2X)	10,0
Mix DNA Extraction Control 670	0,8
Amorce Tay377for à 10 µM	0,8
Amorce Tay488rev à 10 µM	0,8
Sonde TequiFAM à 10 µM	0,2
Eau ultrapure nucléase-free	2,4
Volume total	15

1. Les différents réactifs sont décongelés à température ambiante puis homogénéisés (par exemple par vortexage) avant d'être ajoutés dans un microtube DNase-free de taille appropriée au volume total de mix PCR.
2. Le microtube contenant le mix PCR complet est homogénéisé (par exemple par vortexage) avant d'en répartir 15 µl dans chaque puits ou tube PCR.

8.3 Addition des solutions d'ADN à tester et témoins

L'addition des solutions d'ADN à tester et témoins s'effectue dans une zone physiquement séparée de la zone où se sont effectuées la préparation et la distribution du mix PCR.

1. Ajouter 5 µl de chacun des lysats cellulaires « échantillon » et « témoin » à raison d'un lysat par puits ou tube réactionnel, sauf pour le T_{PCR} négatif où le volume de lysat cellulaire est remplacé par de l'eau ultrapure nucléase-free.
2. Si besoin, centrifuger brièvement la plaque ou les tubes PCR pour éliminer les éventuelles gouttelettes sur le bord des puits ou tubes PCR.

8.4 Amplification par PCR

1. Programme d'amplification :

Cycle	Température	Durée
1	95°C	5 min
40	95°C	10 sec
	60°C	50 sec

La collecte des données de fluorescence s'effectue durant l'étape d'élongation (50 sec à 60°C). Sélectionner un volume final de 20 µl.



2. Programmer sur le thermocycleur la lecture des détecteurs suivants pour chacun des puits à analyser :

Cible	Reporter	Quencher
<i>Tylorella equigenitalis</i>	FAM	TAMRA
Mime (ADN non cible)	Cy5 ou Quasar670	Non fluorescent

3. Placer la plaque ou les tubes PCR dans le thermocycleur.

9 Résultats

9.1 Contrôle de la validité et analyse des résultats

La validation de l'analyse s'effectue en observant les courbes de fluorescence mesurées par le thermocycleur en temps réel générées à partir des différents témoins cible et CI.

Pour chaque fluorophore (un premier pour la détection de la séquence d'ADN cible et un second pour la détection de la séquence d'ADN non cible),

1. Si besoin et à l'aide des options du logiciel pilotant le thermocycleur, l'opérateur fixe la ligne de base (= valeur de bruit de fond retenue) de manière à ce qu'elle soit positionnée le plus bas possible sans inclure le bruit de fond mais suffisamment haut pour croiser les courbes de fluorescence des témoins positifs durant la phase d'accroissement exponentielle de l'amplification et lorsque les valeurs de fluorescence sont représentées en échelle logarithmique.
2. Si besoin et à l'aide des options du logiciel pilotant le thermocycleur, l'opérateur fixe la ligne de seuil (= limite minimale de fluorescence à atteindre pour qu'un signal de fluorescence émis soit significativement supérieur au signal du bruit de fond représenté par la ligne de base) de manière à ce qu'elle croise le milieu des courbes de fluorescence des témoins positifs durant la phase d'accroissement exponentielle de l'amplification et lorsque les valeurs de fluorescence sont représentées en échelle logarithmique.
3. Une fois la ligne de seuil fixée, l'appareil détermine un Ct pour chaque fluorophore et chaque puits ou tube PCR.
4. Pour chaque témoin, l'opérateur observe la présence ou l'absence d'un signal de PCR et contrôle la cohérence de ce signal afin de valider ou invalider les témoins (absence d'une courbe d'amplification pour les témoins négatifs et présence d'une courbe d'amplification caractéristique pour les témoins positifs cible et les CI).
5. Si la série d'analyse est validée, l'opérateur observe la présence ou l'absence d'un signal de PCR et contrôle la cohérence de ce signal pour l'ensemble des échantillons.

Si la série d'analyse n'est pas validée et selon le type d'anomalie observée, tout ou partie du processus analytique est à refaire.



En présence d'une courbe d'amplification non caractéristique (aplaties) de la séquence d'ADN cible mais également de la séquence d'ADN non cible, l'échantillon sera à nouveau analysé :

- i. *après dilution au $1/10^6$ du lysat cellulaire préparé au paragraphe 8.1 ;*
- ii. *après réalisation d'un nouveau lysat cellulaire à partir du prélèvement initial.*

9.2 Expression des résultats

Pour chaque échantillon de matrice « écouvillon », le résultat peut être exprimé comme suit :

- « **Détecté** » lorsque le signal observé est plus précoce ou équivalent à celui observé pour le $T_{PROCESSUS}$ positif et que ce signal correspond à une courbe d'amplification caractéristique ;

*Remarque. Lorsque le signal observé est plus tardif que celui observé pour le $T_{PROCESSUS}$ positif et que ce signal correspond à une courbe d'amplification caractéristique, il est recommandé de moduler l'expression des résultats par exemple par « **Détecté (en limite de détection)** ».*

- « **Non détecté** » en absence de signal ;
- « **Ininterprétable** » lorsqu'un ou plusieurs critères d'analyse du signal ne correspondent pas aux caractéristiques attendues. Par exemple : courbe d'amplification de la séquence d'ADN cible non caractéristique ou insuffisamment caractéristique ; courbe d'amplification de la séquence d'ADN non cible tardive ou absente traduisant la présence d'inhibiteurs ne permettant pas de conclure lors de la non détection de la séquence d'ADN cible.

Pour chaque échantillon de matrice « souche bactérienne », le résultat peut être exprimé comme suit :

- « **Détecté** » en présence d'un signal avec une courbe d'amplification caractéristique ;
- « **Non détecté** » en absence de signal ;
- « **Ininterprétable** » lorsqu'un ou plusieurs critères d'analyse du signal ne correspondent pas aux caractéristiques attendues. Par exemple : courbe d'amplification de la séquence d'ADN cible non caractéristique ou insuffisamment caractéristique ; courbe d'amplification de la séquence d'ADN non cible tardive ou absente traduisant la présence d'inhibiteurs ne permettant pas de conclure lors de la non détection de la séquence d'ADN cible.

10 Caractéristiques de performance de la méthode

Synthèse des caractéristiques de performance extraite du dossier de validation - version 00 établi par le LNR MCE (correspond à Annexe D du dossier de validation).



Caractéristique	Paramètre	Valeur ou résultat obtenu lors de la caractérisation	Principales informations relatives aux modalités de réalisation de la caractérisation
Inclusivité	Pourcentage de souches bactériennes détectées	100%	Déterminée à l'aide d'un panel de 31 souches de <i>Taylorella equigenitalis</i> dont la diversité génétique a été appréhendée par les données de génotypage par MLST à raison d'une souche par ST identifié. Le statut des souches sélectionnées est connu (confirmation de l'espèce bactérienne par bactériologie, immunofluorescence et PCRs conventionnelles spécifiques d'espèce).
Exclusivité	Pourcentage de souches bactériennes non détectées	100%	Déterminée à l'aide d'un panel de souches bactériennes non <i>Taylorella equigenitalis</i> pouvant avoir des concordances avec la séquence d'ADN d'intérêt et/ou se trouvant dans la même niche écologique. Dix-huit espèces bactériennes ont été sélectionnées sur la base de leur présence de façon commensale ou pathogène dans le tractus génital des équidés. A l'exception de <i>Taylorella asinigenitalis</i> , elles ont été testées à raison d'une souche par espèce et il s'agit de souches provenant de la collection de l'Institut Pasteur (souches CIP). L'espèce <i>Taylorella asinigenitalis</i> a quant à elle été étudiée plus en détail car très proche génétiquement de <i>Taylorella equigenitalis</i> : 15 souches ont été sélectionnées à raison d'une souche par ST défini par MLST ; ces souches sont également de statut connu (confirmation de l'espèce bactérienne par bactériologie, immunofluorescence et PCRs conventionnelles spécifiques d'espèce).
LD _{PCR}	Valeur de la LD _{PCR}	La LD _{PCR} au seuil de 95% est ≤ 8 copies d'ADN cible/réaction PCR correspondant à la dilution 10^{-5} d'une suspension de <i>Taylorella equigenitalis</i> obtenue à partir d'une colonie dans 9 ml d'eau physiologique	La LD _{PCR} est le plus petit nombre de copies d'ADN cible par unité de volume qui peut être détecté dans 95% des cas. Elle a été déterminée expérimentalement selon la norme NF U47-600-2 à l'aide de trois gammes de dilution sériées de raison 10 de <i>Taylorella equigenitalis</i> MCE18 réalisées à partir d'une colonie dans 9 ml d'eau physiologique ; la réalisation de ces gammes de dilution a été suivie d'un comptage bactérien pour extrapoler le nombre de copies d'ADN cible (3 copies par génome). Des lysats cellulaires ont ensuite été réalisés sur chaque dilution. Les tests PCR ont finalement été réalisés lors de trois séances indépendantes à raison d'une gamme de dilution par séance, chaque lysat cellulaire étant testé huit fois. La LD _{PCR} correspond à la dilution montrant la détection de l'ADN cible dans 23 réactions de PCR sur 24. La LD _{PCR} a ensuite été confirmée avec trois souches de <i>Taylorella equigenitalis</i> (MCE18, CIP 79.44 et CIP 79.7T) et deux thermocycleurs (Roche et BioRad) selon la norme NF U47-600-1.
LD _{METHODE}	Valeur de la LD _{METHODE}	La LD _{METHODE} au seuil de 100% est ≤ 8 copies d'ADN cible/réaction PCR correspondant aux écouvillons dopés avec la dilution 10^{-5} d'une suspension de <i>Taylorella</i>	La LD _{METHODE} est la plus petite quantité d'analyte par quantité définie de matrice pouvant être détectée de façon répétable (100% des répétitions) dans les conditions expérimentales décrites par la méthode. Elle est établie en prenant en compte toutes les étapes de la méthode d'analyse et est déterminée selon la norme NF U47-600-2. Des écouvillons Amies-charbon ont été dopés en analyte à l'aide de deux gammes de dilution sériées de raison 10 de <i>Taylorella equigenitalis</i> MCE18 (il s'agit des gammes de dilution n°2 et n°3 préparées pour la détermination de la LD _{PCR}). Les écouvillons ainsi préparés ont été conservés 24 h à température ambiante afin de mimer leur transport. Un comptage bactérien a ensuite été réalisé sur un écouvillon par point de gamme en

		<i>equigenitalis</i> obtenue à partir d'une colonie dans 9 ml d'eau physiologique	<p>parallèle de la réalisation d'un lysat cellulaire sur un second écouvillon également par point de gamme. Les tests PCR ont finalement été réalisés lors de deux séances indépendantes à raison d'une gamme de dilution par séance, chaque lysat cellulaire étant testé au moins quatre fois (huit fois pour la première gamme de dilution et quatre fois pour la seconde). La LD_{METHODE} correspond à la dilution montrant la détection de l'ADN cible dans 12 réactions de PCR sur 12.</p> <p>D'après les résultats de comptages bactériens, la LD_{METHODE} au seuil de 100% était de 0,10 copie d'ADN cible par réaction de PCR ce qui n'est pas réaliste. Ceci a été expliqué par la perte de près de deux log des <i>Taylorella equigenitalis</i> comptées au moment de l'écouvillonnage ayant pour conséquence une meilleure sensibilité de la PCR par rapport à la bactériologie. Cet état de fait est cohérent avec la confirmation de la présence d'une amplification de l'ADN cible à la dilution 10⁻⁵ après séquençage des produits de PCR obtenus. Ne pouvant tenir compte de la calibration des suspensions bactériennes en UFC, et les écouvillons utilisés pour la détermination de la LD_{METHODE} ayant été produits à partir des gammes de dilution « LD_{PCR} » n°2 et n°3, la détermination de la LD_{METHODE} a finalement été réalisée par prédiction inverse à partir des droites d'étalonnage issues des valeurs de Ct des séances 2 et 3 de la détermination de la LD_{PCR}.</p>
Sensibilité diagnostique	Pourcentage de détection d'écouvillons de terrain de statut positif	100%	En l'absence d'écouvillons de terrain positifs, la sensibilité diagnostique a été déterminée à l'aide d'un panel d'écouvillons de terrain de statut négatif dopés avec les 31 suspensions cellulaires de <i>Taylorella equigenitalis</i> (une par écouvillon) préparées pour le test d'inclusivité.
Spécificité diagnostique	Pourcentage de non détection d'écouvillons de terrain de statut négatif non détecté	≥ 96%	Déterminée à l'aide d'un panel de 181 écouvillons de terrain de statut négatif.
Robustesse	Résultats avec hors écouvillons délai	Valeurs de Ct comparables entre écouvillons conservés à température ambiante 24 h ou 72 h après réalisation des prélèvements par écouvillonnage	Appréhendée par la comparaison d'échantillons réalisés à partir des mêmes suspensions bactériennes mais avec deux conditions de conservation : 24 h à température ambiante afin de miner le transport et 72 h à température ambiante afin de mimer un transport hors délai selon le règlement d'exécution (UE) N° 846/2014 qui précise que la méthode PCR doit être mise en œuvre dans un délai de 48 heures suivant le prélèvement des échantillons.