



## ADIAVET™ ANA PHA REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DES TROIS BIOVARS *D'ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

**Références :**

418028-50 (50 réactions)

418028 (100 réactions)



**NOTE**

Les fluorochromes présents dans ce produit sont vendus sous licence de Biosearch Technologies, Inc. et protégés par des brevets, soit délivrés, soit en cours de demande, aux Etats Unis et dans le monde entier. La licence couvre le Diagnostic Moléculaire Vétérinaire.

# ADIAVET™ ANA PHA REAL TIME

<b>HISTORIQUE DES REVISIONS.....</b>	<b>3</b>
<b>I. INFORMATIONS GENERALES .....</b>	<b>4</b>
1. But de l'essai.....	4
2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	4
3. Description et principe du test.....	4
<b>II. MATERIEL ET REACTIFS .....</b>	<b>5</b>
1. Réactifs fournis dans le kit.....	5
2. Validité et conservation.....	5
3. Utilisation du « ANA PHA CTL+» .....	5
4. Utilisation du « Exogenous IPC» .....	5
5. Matériel nécessaire mais non fourni.....	5
<b>III. PRECONISATIONS AVANT L'ANALYSE DES ECHANTILLONS.....</b>	<b>6</b>
1. Précautions.....	6
2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN .....	6
3. Préparation des prélèvements.....	6
4. Préparation des témoins.....	7
<b>IV. EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS .....</b>	<b>8</b>
1. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit.....	8
2. Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue.....	9
3. Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN .....	10
<b>V. AMPLIFICATION.....</b>	<b>11</b>
<b>VI. INTERPRETATION DES RESULTATS.....</b>	<b>12</b>
1. Définitions .....	12
2. Validation et interprétation des résultats .....	12
A. <i>Validation de l'essai</i> .....	12
B. <i>Interprétation des résultats</i> .....	13
<b>VII. INDEX DES SYMBOLES.....</b>	<b>14</b>

## Historique des révisions

---

N/A	Non Applicable (première publication)
Correction	Correction des anomalies du document
Modification technique	Addition, révision et/ou suppression d'information liée au produit
Administratif	Modifications non techniques notables pour l'utilisateur

NB : toute modification mineure, typographique grammaticale et mise en page, ne figurent pas l'historique des révisions

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2014/09	NF113-01	N/A	première publication
2016/07	NF113-02	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF113-02	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF113-02	Administratif	Ajout tableau « Types de prélèvements » §1.3
2016/07	NF113-02	Administratif	Ajout référence 418028-50 (50 réactions)

## I. Informations générales

### 1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ ANA PHA REAL TIME permet de détecter *Anaplasma phagocytophilum* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon, de tique et de prélèvement de sang total de bovin, d'ovin, de cervidé sauvage et d'équin, ainsi qu'à partir de prélèvement de tissu de bovin, d'ovin et de cervidé sauvage.

### 2. *Anaplasma phagocytophilum*

*Anaplasma phagocytophila* est une nouvelle combinaison de biovars validement publiée le 15 novembre 2001 et dont l'épithète spécifique a été corrigée le 14 janvier 2002 en *phagocytophilum*. Ce taxon rassemble non seulement *Ehrlichia phagocytophila* mais encore *Ehrlichia equi* et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (agent EGH ou HGE pour human granulocytic ehrlichiosis).

Les souches d'*Anaplasma phagocytophilum* se présentent sous la forme de bactéries à Gram négatif, de petite taille, infectant les cellules de la lignée myéloblastique des mammifères, notamment les granulocytes neutrophiles et, dans une moindre mesure, les granulocytes éosinophiles.

*Anaplasma phagocytophilum* est un parasite strict des tiques et des mammifères, les animaux domestiques et sauvages constituant les réservoirs de germes. Cette bactérie est transmise aux mammifères sains par des tiques du genre *Ixodes* notamment *Ixodes ricinus* en Europe. Chez les tiques infectées, *Anaplasma phagocytophilum* est localisée principalement dans les glandes salivaires.

Le biovar Phagocytophilum est responsable d'une maladie des ruminants connue chez les ovins sous le nom de "fièvre à tiques" ("tick-borne fever") et, chez les bovins, sous le nom de "fièvre des pâturages" ("pasture fever"). L'infection a été identifiée principalement en Europe (Royaume Uni, Norvège, Finlande, Suède, Irlande, Pays Bas, Autriche, Allemagne, France, Espagne, Suisse...) mais également en Inde et en Afrique du Sud. La maladie affecte les ruminants sauvages (notamment les cervidés et les bovidés) et les ruminants domestiques (notamment les moutons et les bovins). La période d'incubation est de 3 à 6 jours chez les ovins et de 4 à 17 jours chez les bovins. Le principal symptôme est une fièvre élevée dont la durée est variable. La fièvre s'accompagne d'une anorexie, d'une perte de poids et d'une chute de la production lactée qui peut être très brutale et massive. Les autres signes cliniques consistent en un œdème froid du tarso-métatarse (maladies des gros paturons) des bovins et entraînant des troubles locomoteurs, une atteinte respiratoire, des avortements, des infections *in utero* conduisant à la naissance d'un nouveau-né contaminé et de l'infertilité chez les mâles. Les moutons infectés restent porteurs durant une longue période (jusqu'à deux ans) alors que le portage est plus bref chez les bovins.

### 3. Description et principe du test

Ce test repose sur l'amplification enzymatique de gène ou technique PCR.

Les produits amplifiés sont détectés en temps réel grâce au marquage spécifique de sondes d'hydrolyse (technologie 5'-exonucléase).

Le kit ADIAVET™ ANA PHA REAL TIME peut détecter simultanément

- *Anaplasma phagocytophilum* (sonde marquée en FAM)
- GAPDH un contrôle interne d'extraction et d'amplification spécifique d'ADN endogène (sonde marquée avec un fluorochrome lu dans le même spectre que VIC et HEX).

Adiagène a validé ce test avec différents kits de purification d'ADN (Qiagen et Macherey-Nagel). D'autres kits de purification peuvent être utilisés s'ils sont validés par l'utilisateur.

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Écouvillon (placentaire, vaginal...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Tique	<input checked="" type="checkbox"/>	Larves : de 10 à plusieurs centaines Nymphes : entre 3 et 40 Tiques adultes mâles : 1 à 15 Tiques adultes femelles non gorgées : 1 à 12 Tiques adultes femelles gorgées : 1 à 3 (selon la taille)
Sang total	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Tissu (placenta, tissus fœtaux...)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

\* Dépend de la situation épidémiologique et de la qualité de l'échantillon.

## II. Matériel et réactifs

### 1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	418028-50 (50R)	418028 (100R)
A5	Solution d'amplification	1 x 1000 µl tube vert	2 x 1000 µl tubes verts
ANA PHA CTL+	Contrôle positif <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	1 tube violet	1 tube violet
Exogeneous IPC	Contrôle exogène non cible d'amplification	1 tube violet	1 tube violet

### 2. Validité et conservation

A réception, le kit doit être stocké à <-15°C.

Il est recommandé d'aliquoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongelations.

**Ne pas décongeler plus de 3 fois.**

Les réactifs temps réel sont sensibles à la lumière : les conserver à l'obscurité.

Le réactif « A5 » est prêt à être utilisé pour la réaction PCR.

**Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.**

### 3. Utilisation du « ANA PHA CTL+ »

« ANA PHA CTL+ » est un témoin positif d'amplification.

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « ANA PHA CTL+ » et mélanger en vortexant au moins 20 secondes.

Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, utiliser 5 µl de « ANA PHA CTL+ » dans un des puits.

### 4. Utilisation du « Exogenous IPC »

« Exogenous IPC » est un contrôle interne de purification à utiliser lors d'analyse à partir de tiques.

Ajouter **100 µl** d'eau Nuclease-free au « Exogenous IPC » et mélanger en vortexant au moins 20 secondes.

Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, utiliser 2 µl de « Exogenous IPC » par échantillon à extraire.

### 5. Matériel nécessaire mais non fourni

**Attention : le consommable utilisé doit être Nuclease-free (par exemple autoclavé deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C)**

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel : tubes PCR de 0,2 ml ou plaques PCR 96 puits fermées de qualité optique
- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Centrifugeuse pour microtubes
- Vibrobroyeur à billes (Mixer Mill, Fast Prep ou Rybolyser)
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Vortex
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Billes d'acier inoxydable 3 mm
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free
- Tampon PBS
- Eau PPI
- **Kit d'extraction d'ADN en colonne individuelle**
  - QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)
  - NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, 50 tests : réf.740952.50 ou 250 tests : réf. 740952.250)
- **Kit d'extraction d'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate**

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

### III. Préconisations avant l'analyse des échantillons

---

**Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.**

#### 1. Précautions

Adiagène a validé ce test avec les kits d'extraction d'ADN des sociétés Qiagen et Macherey-Nagel. D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés avec une validation préalable.

**Respecter les recommandations des fabricants pour la conservation, la préparation et l'utilisation des réactifs contenus dans les kits d'extraction.**

Certains kits contiennent et/ou nécessitent l'utilisation de composés toxiques. Ces produits doivent être manipulés avec des gants et sous hotte chimique.

Nous conseillons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude et la précision des micropipettes utilisées. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire.

La réaction PCR génère de grandes quantités d'ADN amplifié. Quelques molécules de produits amplifiés peuvent générer des résultats positifs. Il est donc important de bien séparer la zone d'analyse des produits amplifiés de la zone où sont manipulés les échantillons à analyser et de ne pas ouvrir les tubes après amplification.

Les échantillons à analyser doivent être manipulés et éliminés comme des déchets biologiques. **Prendre toutes les dispositions de sécurité et de confinement requises pour la manipulation des agents biologiques concernés.**

*Nous vous recommandons de faire des fractions aliquotées d'eau déminéralisée et d'eau physiologique, de les autoclaver (25 minutes à +120°C) et de changer de tube d'eau lors de chaque manipulation afin d'éviter toute contamination.*

#### 2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN

Les échantillons se conservent un ou deux jours à +2/8°C. Au-delà de 2 jours, il est conseillé de les conserver à <-15°C. Exception faite du sang avec anticoagulant qui ne doit pas être congelé.

Les ADN extraits sont des molécules sensibles. Les extraits d'ADN peuvent être stockés dès la fin de l'extraction à +2/8°C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

#### 3. Préparation des prélèvements

Les sangs doivent être prélevés sur anticoagulant, privilégier l'EDTA (citrate ou héparine risquent d'être inhibiteurs).

Les tiques et larves peuvent être analysés en mélange :

- Larves : jusqu'à plusieurs centaines
- Nymphes : jusqu'à 40
- Tiques adultes mâles : jusqu'à 15
- Tiques adultes femelles non gorgées : jusqu'à 12
- Tiques adultes femelles gorgées : jusqu'à 3 (selon la taille)

Les larves, les nymphes et les tiques adultes mâles et femelles non gorgées peuvent être déposés dans un microtube sans dilacération.

Pour les femelles gorgées seule la tête est utilisée. Il est recommandé de faire la dissection sous Poste de Sécurité Microbiologique de type II dans une boîte de pétri à l'aide d'un scalpel. Il est recommandé de changer de lame de scalpel et de boîte de pétri entre chaque lot de tiques.

*Cf. § IV pour l'extraction et la purification des ADN pour toutes les matrices.*

#### 4. Préparation des témoins

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats.

Les témoins sont à inclure par série d'analyse. Une série est définie comme un ensemble d'échantillons pour lesquels chaque étape a été réalisée dans les mêmes conditions.

**L'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelles que soient les matrices, est validé grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit.**

- Le contrôle interne endogène (GAPDH) naturellement présent dans le prélèvement permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « ANA PHA CTL+ » permet de valider l'amplification de la cible.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés.

- **Témoin négatif d'extraction (obligatoire)**

Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, au moins un témoin négatif doit être intégré dans chaque série d'extraction. Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou du tampon de dilution (par exemple du PBS 1X).

- **Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)**

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant *A. phagocytophilum*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *A. phagocytophilum*. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la LD<sub>METHODE</sub>. Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

## IV. Extractions et purifications

### 1. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

*Cas particulier des placentas :*

**Susceptibles de contenir une très grande quantité de microorganismes, ils doivent être manipulés avec précaution.**

Possibilité N°1

*Inciser chaque cotylédon avec un scalpel et frotter à l'intérieur avec un écouvillon sec.*

*L'analyse est réalisée en suivant le protocole écouvillon.*

Possibilité N°2

*Suivre le protocole tissu.*

	Ecouvillon	Tissu	Sang	Larve et tique
<b>Préparation de l'échantillon</b>	Vortexer l'écouvillon dans <b>1 ml</b> de <b>tampon PBS 1X</b> Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube.	Peser <b>20 à 30 mg</b> de tissu dans un microtube	Placer <b>500 µl</b> de <b>sang de bovin</b> ou <b>100 µl</b> de <b>sang de cheval</b> dans un tube. Ajouter <b>1 ml</b> d' <b>eau PPI</b> . Vortexer, puis incuber 10 minutes sur glace en fusion (~0°C). Centrifuger 5 minutes à 6 000 g Eliminer le surnageant. Ajouter <b>1 ml</b> d' <b>eau PPI</b> . Vortexer, puis centrifuger 5 minutes à 6 000 g. Eliminer le surnageant.	Placer les larves ou tiques dans un microtube. (cf. § III.3. pour connaître le nombre à traiter). Ajouter <b>180 µl</b> de <b>tampon ATL</b> et <b>20 µl</b> de <b>protéinase K</b> et <b>2 µl</b> de <b>« Exogeneous IPC »</b> . Broyer* Incuber entre 4 heures et 1 nuit à +55°C.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>180 µl</b> de <b>tampon ATL</b> et <b>20 µl</b> de <b>protéinase K</b> . Vortexer. Incuber <b>30 minutes</b> à +70°C (ou <b>1 nuit</b> à +56°C).			
	Ajouter <b>200 µl</b> de <b>tampon AL</b> . Vortexer. Incuber <b>10 minutes</b> à +70°C.			
<b>Préparation de la fixation</b>	Ajouter <b>200 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou au vortex (~15 secondes).			
<b>Transfert sur colonnes et fixation à la membrane</b>	Identifier les colonnes, déposer <b>la totalité</b> de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>			
<b>1<sup>er</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW1</b> . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.			
<b>2<sup>ème</sup> lavage</b>	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW2</b> . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.			
<b>Séchage de la colonne</b>	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.			
<b>Elution</b>	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>200 µl</b> de <b>tampon AE</b> . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.			
<b>Conservation</b>	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.			

\* Par exemple, à l'aide d'un Mixer Mill : ajouter 1 bille d'acier inoxydable (3 mm), broyer 4 minutes à 30 Hz.

## 2. Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

*Cas particulier des placentas :*

**Susceptibles de contenir une très grande quantité de microorganisme, ils doivent être manipulés avec précaution.**

Possibilité N°1

*Inciser chaque cotylédon avec un scalpel et frotter à l'intérieur avec un écouvillon sec.*

*L'analyse est réalisée en suivant le protocole écouvillon.*

Possibilité N°2

*Suivre le protocole tissu.*

	Ecouvillon	Tissu	Sang
Préparation de l'échantillon	Vortexer l'écouvillon dans 1 ml de tampon PBS 1X Transférer 200 µl dans un microtube.	Peser 20 à 30 mg de tissu dans un microtube	Placer 500 µl de sang de bovin ou 100 µl de sang de cheval dans un tube. Ajouter 1 ml d'eau PPI. Vortexer, puis incubé 10 minutes sur glace en fusion (~0°C). Centrifuger 5 minutes à 6 000 g. Éliminer le surnageant. Ajouter 1 ml d'eau PPI. Vortexer, puis centrifuger 5 minutes à 6 000 g Éliminer le surnageant.
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon T1 et 25 µl de protéinase K. Vortexer. Incuber 30 minutes à +70°C (ou 1 nuit à +56°C).		
	Ajouter 200 µl de tampon B3. Vortexer. Incuber 10 minutes à +70°C.		
Préparation de la fixation	Ajouter 200 µl d'éthanol 100%. Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou au vortex (~15 secondes).		
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer la totalité de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>		
1 <sup>er</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
2 <sup>ème</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 600 µl de tampon B5. Centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Séchage de la colonne	Changer le tube collecteur. Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.		
Elution	Transférer la colonne sur un microtube. Déposer 200 µl de tampon BE. Incuber ~1 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.		
Conservation	Fermer les tubes, identifier et conserver à +2/8°C pendant 24 heures, puis à <-15°C.		

### **3. Extraction avec le kit Billes magnétiques ARN/ADN**

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit ADIAVET™ utilisé.

## V. Amplification

---

a - Déterminer le nombre d'échantillons à analyser, y compris les témoins utilisés (par exemple les témoins positif et négatif d'extraction, le témoin positif d'amplification (« CTL+ ») et le témoin réactif d'amplification (NTC ou No Template Control)).

b - Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Bien vortexer. Répartir **20 µl** dans chacun des tubes PCR ou des puits de la plaque PCR avec une pipette munie de pointes Nuclease-free.

c- **Remplacer immédiatement le tube « A5 » à <-15°C et à l'obscurité.**

d- Pour chaque échantillon, le témoin négatif d'extraction (obligatoire) et le témoin positif d'extraction (recommandé), ajouter **5 µl** d'extrait purifié aux **20 µl** de réactif « A5 ».

Pour le CTL+, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3.) aux 20 µl de réactif « A5 ».

Pour le témoin réactif d'amplification (NTC), ne rien ajouter au réactif « A5 ».

**Remplacer immédiatement les extraits d'ADN purifiés à +2/8°C ou <-15°C.** Éliminer les bulles qui pourraient rester au fond des puits.

e- Démarrer le run rapidement après la mise en place de la plaque ou des tubes dans le cycleur.

La cible *Anaplasma phagocytophilum* est lue en FAM. Le contrôle interne est lu en VIC ou HEX. Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive ROX pour les appareils ABI. La lecture de la fluorescence s'effectue pendant l'étape d'élongation (1 minute à 60°C).

Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism** (type 7500, Step-one...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour le **Rotorgene** de **Qiagen** et pour le **Chromo 4** de **Biorad** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

**15** secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

Le programme ci-dessous concerne les **MX3000P** et **MX3005P** de **Stratagène** :

2 minutes à 50°C

10 minutes à 95°C

**30** secondes à 95°C et 1 minute à 60°C pendant 45 cycles

**Roche diagnostic : LightCycler 2\*, LightCycler 480\***

**\* NOTE :** L'utilisation de thermocycleurs *LightCycler* nécessite au préalable une manipulation de calibration. Nous fournissons la procédure et les réactifs nécessaires à cette calibration.

Contactez-nous si vous souhaitez utiliser d'autres appareils.

## VI. Interpretation des résultats

### 1. Définitions

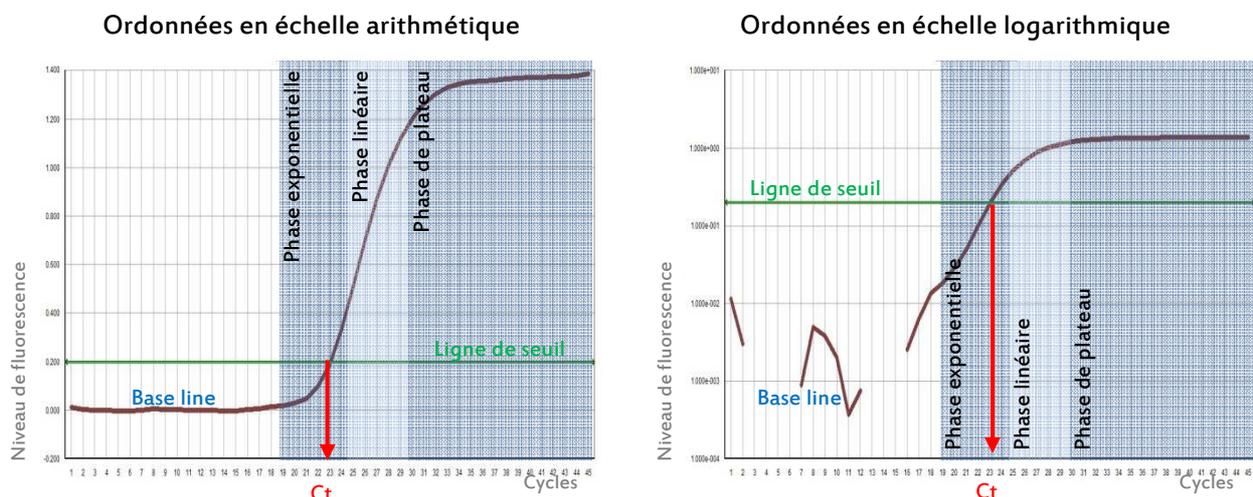
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

Le terme « **courbe d'amplification caractéristique** » qualifie une courbe de fluorescence avec une phase exponentielle, une phase linéaire et une phase de plateau.

La « **ligne de seuil** » ou « **threshold line** » doit être placée au-dessus de la ligne de base, dans la phase exponentielle d'une courbe d'amplification caractéristique ou d'un ensemble de courbes d'amplification caractéristiques.

Le « **cycle seuil** » ou « **threshold cycle** » (**Ct**) d'un puits correspond, pour chaque fluorophore détecté, à l'abscisse du point d'intersection entre la ligne de seuil et la courbe d'amplification. La valeur de Ct exprimée par l'appareil pour chaque puits dépend ainsi de la position de la ligne seuil et de la charge d'analytes initialement présents dans le tube PCR.

Exemple d'une courbe d'amplification caractéristique :



### 2. Validation et interprétation des résultats

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM et positionner la ligne de seuil selon les indications ci-dessus. Procéder de la même façon pour les courbes en VIC/HEX.

#### A. Validation de l'essai

L'amplification est **valide** si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins :

Témoins	Témoin réactif (NTC)	Témoin positif d'amplification (CTL+)	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM	non	oui	non	oui
Amplification VIC/HEX	non	non/oui	non	non/oui
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible	Absence de contamination pour l'extraction	Etapas d'extraction et d'amplification

\* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et VIC/HEX pour le témoin positif (« CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

## B. Interprétation des résultats

L'extraction de l'ADN et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en *A. phagocytophilum* (FAM) ou en contrôle interne (VIC/HEX).

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Non
Résultat	Négatif	Positif	Positif	Non déterminé A refaire

L'échantillon est considéré comme **négatif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC ou HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM (exemple A).

L'échantillon est considéré comme **positif** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemple B). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié (exemple C).

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple D) indique une déficience de l'extraction de l'ADN (perte ou destruction de l'ADN) ou une PCR temps-réel défectueuse (présence d'inhibiteurs dans l'échantillon, erreur de programme ou absence d'échantillon). Dans ce cas, il est conseillé de refaire le test en utilisant l'extrait d'ADN pur et dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau Nuclease-free. Dans un second temps, si le test n'est toujours pas validé, une nouvelle extraction de l'ADN total de l'échantillon est souhaitable.

## VII. Index des symboles

---

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Conserver à l'abri de la lumière
	Pour usage vétérinaire in vitro uniquement – Pour usage animal uniquement

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE et ADIAVET™ sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à ADIAGENE et/ou Bio-X Diagnostics ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.