



ADIAVET™ ORT REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* PAR
AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

Référence :
416443 (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™ ORT REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	But de l'essai	4
2.	Pathogène	4
3.	Description et principe du test	4
III.	MATERIEL ET REACTIFS	5
1.	Réactifs fournis dans le kit	5
2.	Validité et conservation	5
3.	Utilisation du « ORT CTL+ »	5
4.	Matériel nécessaire mais non fourni	5
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS	6
1.	Précautions	6
2.	Recommandations de prélèvements et de transport	6
	A. <i>Sur les animaux vivants</i>	6
	B. <i>Sur les animaux morts</i>	6
	C. <i>Dans les bâtiments</i>	6
3.	Conservation des échantillons et des extraits d'ADN	7
4.	Témoins à inclure	7
V.	EXTRACTION ET PURIFICATION	8
1.	Avec le kit ADIAPURE™ PURIFICATION	8
2.	Avec le kit QIAamp® DNA Mini kit	8
	A. <i>Traitement des échantillons</i>	8
	B. <i>Purification de l'ADN</i>	9
3.	Avec le kit NucleoSpin® Tissue	10
	A. <i>Traitement des échantillons</i>	10
	B. <i>Purification de l'ADN</i>	11
VI.	AMPLIFICATION	12
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS	13
1.	Définitions	13
2.	Validation et interprétation des résultats	13
	A. <i>Validation de l'essai</i>	13
	B. <i>Interprétation des résultats</i>	14
VIII.	INDEX DES SYMBOLES	15

I. 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 de mise en page ne figurent pas dans l'historique des révisions.

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2014/02	NF262-03	Correction	Suppression de la mention d'avertissement, § III.1, en page 5.
2014/12	NF262-04	Modification technique	Suppression de la référence 416442 (50 réactions)
2016/07	NF262-05	Administratif	Modification des logos
2016/07	NF262-05	Administratif	Ajout des exigences légales Biosearch
2016/07	NF262-05	Administratif	Ajout tableau « types de prélèvements » §I.3

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ ORT REAL TIME permet de détecter *Ornithobacterium rhinotracheale* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon de poulet et de dinde, ainsi qu'à partir de prélèvement environnemental.

2. Pathogène

Ornithobacterium rhinotracheale est un bacille gram négatif, non sporulé, immobile, unique espèce du genre *Ornithobacterium* recensée à ce jour. Il est responsable de troubles respiratoires et articulaires chez diverses espèces d'oiseaux, notamment le poulet et la dinde.

Les signes cliniques sont une diminution de la croissance, une toux et un jetage nasal, parfois une sinusite.

Le diagnostic clinique et lésionnel offre peu d'intérêt car il n'est pas spécifique. Un diagnostic bactériologique différentiel doit être établi avec *Pasteurella multocida*, *Riemerella anapestifer*, *Haemophilus paragallinarum* et *Coenonia anatina*. Le diagnostic sérologique repose sur l'utilisation de tests ELISA. Cependant ces tests ne permettent pas de diagnostiquer une infection aigüe car les anticorps apparaissent assez tardivement et leur niveau de sécrétion peut être altéré par la mise en place d'un traitement antibiotique précoce.

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™ ORT REAL TIME peut détecter simultanément

- ORT (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 (Adiagène, 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 sur animaux vivants (trachéal, fente palatine...)	<input checked="" type="checkbox"/>	6
Écouvillon sur animaux morts (organe lésé, articulation...)	<input checked="" type="checkbox"/>	6
Prélèvement environnemental	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

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

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

Désignation	Réactif	416443 (100R)
A5	Solution d'amplification	2 x 1000 µl tube verts
ORT CTL+	Contrôle positif <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	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 « ORT CTL+ »

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « ORT CTL+ » fourni dans le kit. Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex, au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, nous recommandons d'utiliser 5 µl de « ORT CTL+ » dans un des puits.

4. 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
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant
- Appareil d'homogénéisation pour tubes
- 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
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Ethanol 96-100%
- Ecouillons steriles
- Eau peptonée
- Eau déminéralisée stérile
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/l)
- Tampon PBS 1X

- 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)

ou

- Kit d'extraction d'ADN en format plaque 96

- ADIAPURE™ PURIFICATION (Bio-X Diagnostics, 192 tests : réf. ADIADP001-192 ou 480 tests : réf. ADIADP001-480)

IV. Traitement des échantillons et des témoins

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 Adiagène, Qiagen, 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. Recommandations de prélèvements et de transport

Les prélèvements pour diagnostic doivent être effectués à un stade précoce de la maladie. En effet, il a été montré que le réisolement d'ORT après infection expérimentale n'est plus possible dans la trachée 7 jours après l'infection.

Il est conseillé d'utiliser des écouvillons préalablement humidifiés dans de l'eau peptonée à 2% ou des écouvillons sur gaine de charbon. Des chiffonnettes sèches peuvent être utilisées pour des prélèvements de surface.

A. Sur les animaux vivants

Écouvillonner la trachée, ou la fente palatine s'il s'agit de jeunes animaux. Faire un écouvillon par animal. Replacer l'écouvillon dans sa gaine et l'acheminer à +2/8°C au laboratoire dans les meilleurs délais.

B. Sur les animaux morts

Écouvillonner les organes lésés (sacs aériens, trachée, poumons, articulations...). Replacer l'écouvillon dans sa gaine et l'acheminer à +2/8°C au laboratoire dans les meilleurs délais.

C. Dans les bâtiments

Passer une chiffonnette sèche sur les surfaces à tester. Mettre la chiffonnette dans un sachet hermétique et l'acheminer au laboratoire dans les meilleurs délais.

3. 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.

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.

4. Témoins à inclure

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 « ORT 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 de l'eau physiologique ou 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 ORT. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution d'ORT. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la LD_{METHODE}. Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

V. Extraction et purification

1. Avec le kit ADIAPURE™ PURIFICATION

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

2. Avec le kit QIAamp® DNA Mini kit

Avant le début de l'essai, allumer un bain-marie ou une étuve à +56°C et un bain-marie ou un bloc chauffant à +70°C.

*Pour chaque échantillon analysé, placer 180 µl de tampon ATL et 20 µl de **proteinase K** (QIAamp® DNA Mini Kit) dans un microtube.*

A. Traitement des échantillons

a) À partir d'écouvillons

Homogénéiser les écouvillons dans le mélange tampon **ATL + proteinase K**. Placer un écouvillon par microtube ou homogénéiser successivement 3 écouvillons dans ce mélange (**ATL+proteinase K**) dans le cas d'un pool. Essorer l'écouvillon contre le bord du tube pour recueillir le maximum de tampon.

Si les écouvillons ont été peu ou pas humidifiés, ils vont absorber l'ensemble du réactif. Dans ce cas, doubler la quantité de réactif **ATL** (360 µl) et de **proteinase K** (40 µl).

b) À partir de culture solide

Prendre un écouvillon légèrement humidifié avec de l'eau peptonée à 2% et écouvillonner la boîte. Placer ensuite cet écouvillon dans 180 µl de tampon **ATL** et 20 µl de **proteinase K**. Homogénéiser l'ensemble pendant 5 secondes. Essorer l'écouvillon contre le bord du tube pour recueillir le maximum de tampon.

c) À partir de culture liquide

Centrifuger entre 100 à 500 µl de culture dans un microtube (10 000 g, 20 minutes) et reprendre le culot dans 180 µl de tampon **ATL** additionné de 20 µl de **proteinase K**. Homogénéiser pour remettre le culot en suspension.

d) À partir de chiffonnettes

Ajouter 30 ml d'eau peptonée dans le sachet contenant la chiffonnette sèche. Homogénéiser en malaxant le sachet. Si la chiffonnette a absorbé la totalité du liquide, ajouter 10 ml d'eau peptonée et malaxer à nouveau le sachet.

Prélever 200 µl de suspension à l'aide d'une pipette 2 ml et les déposer dans un microtube stérile de 1,5 ml contenant 180 µl de tampon **ATL** et 20 µl de **proteinase K**.

B. Purification de l'ADN

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Lyse	Incuber 15 minutes à +56°C . Homogénéiser de temps en temps pendant l'incubation. Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation. Ajouter 200 µl de tampon AL . Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C . Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation.
Préparation de la fixation	Ajouter 210 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser. Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Déposer la totalité du mélange sur la colonne correspondante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Lavage au tampon AW1	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Lavage au tampon AW2	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . Centrifuger 3 minutes 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 100 µl de tampon AE . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes et les conserver à +2/8°C si l'analyse est réalisée dans les 24 heures ou à <-15°C .

3. Avec le kit NucleoSpin® Tissue

Avant le début de l'essai, allumer un bain-marie ou une étuve à +56°C et un bain-marie ou un bloc chauffant à +70°C.

*Pour chaque échantillon analysé, placer **180 µl** de tampon **T1** et **25 µl** de **proteinase K** (NucleoSpin® Tissue kit) dans un microtube.*

A. Traitement des échantillons

a) À partir d'écouvillons

Homogénéiser les écouvillons dans le mélange tampon **T1** + **proteinase K**. Placer un écouvillon par microtube ou homogénéiser successivement 3 écouvillons dans ce mélange (**T1+proteinase K**) dans le cas d'un pool. Essorer l'écouvillon contre le bord du tube pour recueillir le maximum de tampon.

Si les écouvillons ont été peu ou pas humidifiés, ils vont absorber l'ensemble du réactif. Dans ce cas, doubler la quantité de réactif **T1** (360 µl) et de **proteinase K** (50 µl).

b) À partir de culture solide

Prendre un écouvillon légèrement humidifié avec de l'eau peptonée à 2% et écouvillonner la boîte. Placer ensuite cet écouvillon dans **180 µl** de tampon **T1** et **25 µl** de **proteinase K**. Homogénéiser l'ensemble pendant 5 secondes. Essorer l'écouvillon contre le bord du tube pour recueillir le maximum de tampon.

c) À partir de culture liquide

Centrifuger entre **100 à 500 µl** de **culture** dans un microtube (10 000 g, 20 minutes) et reprendre le culot dans **180 µl** de tampon **T1** additionné de **25 µl** de **proteinase K**. Homogénéiser pour remettre le culot en suspension.

d) À partir de chiffonnettes

Ajouter **30 ml** d'eau peptonée dans le sachet contenant la chiffonnette sèche. Homogénéiser en malaxant le sachet. Si la chiffonnette a absorbé la totalité du liquide, ajouter 10 ml d'eau peptonée et malaxer à nouveau le sachet.

Prélever **200 µl** de suspension à l'aide d'une pipette 2 ml et les déposer dans un microtube stérile de 1,5 ml contenant **180 µl** de tampon **T1** et **25 µl** de **proteinase K**.

B. Purification de l'ADN

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

Avant le début de l'extraction, identifier les microtubes et les colonnes (1 par échantillon) nécessaires à la purification de l'ADN.

Lyse	Incuber 15 minutes à +56°C . Homogénéiser de temps en temps pendant l'incubation. Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation. Ajouter 200 µl de tampon B3 . Homogénéiser. Incuber 10 minutes à +70°C . Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation.
Préparation de la fixation	Ajouter 210 µl d' éthanol 100% . Homogénéiser. Centrifuger brièvement pour éliminer la condensation.
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Déposer la totalité du mélange sur la colonne correspondante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Lavage au tampon BW	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Lavage au tampon B5	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon B5 . Centrifuger 3 minutes 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 100 µl de tampon BE . Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.
Conservation	Fermer les tubes et les conserver à +2/8°C si l'analyse est réalisée dans les 24 heures ou à <-15°C .

VI. 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 (No Template Control ou NTC)).

b - Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Bien homogénéiser. 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 témoin positif, 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 ORT 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

Le programme thermique du kit ADI013 peut également être utilisé.

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.

VII. Interpretation des résultats

1. Définitions

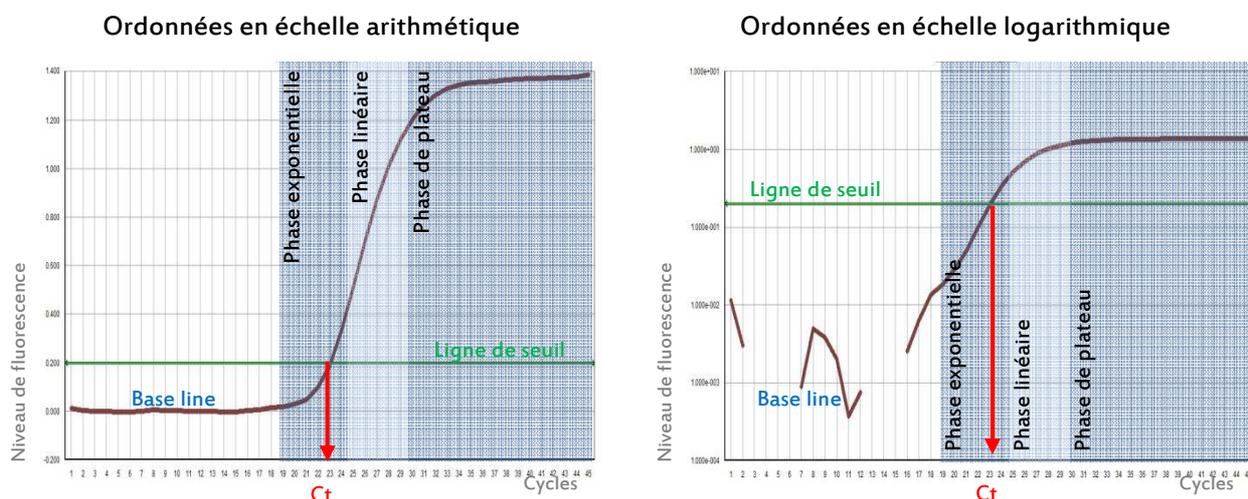
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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 ou HEX.

A. Validation de l'essai

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

Témoins	Témoin réactif (NTC)	ORT 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	Etapes d'extraction et d'amplification

* optionnel

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

B. Interprétation des résultats

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

Exemple	A	B	C	D
Amplification FAM	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Non	Oui	Non
Resultat	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^{ème} 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.

VIII. 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, ADIAPURE™ 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.



 **S.A.R.L. ADIAGENE**
9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

RCS 417 876 299
Tel. +33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com