



ADIAVET™ MS-H DIVA FAST TIME

**TEST POUR LA DETECTION ET LA DIFFERENCIATION DES SOUCHES TERRAINS
MYCOPLASMA SYNOVIAE DU VACCIN MS-H PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE
DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)**

Référence :
ADI561-100 (100 réactions)



ADIAVET™ MS-H DIVA FAST TIME

HISTORIQUE DES REVISIONS.....	3
I. INFORMATIONS GENERALES	4
1. But de l'essai.....	4
2. Description et principe du test.....	4
II. MATERIEL ET REACTIFS	5
1. Réactifs fournis dans le kit.....	5
2. Validité et conservation.....	5
3. Utilisation du « MS-H CTL+ »	5
4. Utilisation du « MS CTL+ »	5
5. Utilisation du « EPC-Amp » :.....	5
6. Matériel nécessaire mais non fourni.....	5
III. PRECONISATIONS AVANT L'ANALYSE DES ECHANTILLONS.....	7
1. Précautions.....	7
2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN	7
3. Préparation des témoins.....	7
IV. EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS	8
1. Extraction avec le kit ADIAPURE™ SLB	8
a) Réactifs fournis dans le kit	8
b) Protocole.....	8
2. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit.....	9
a) Préparation des échantillons.....	9
b) Protocole.....	10
V. AMPLIFICATION.....	11
VI. INTERPRETATION DES RESULTATS.....	12
1. Définitions	12
2. Validation et interprétation des résultats	12
b) Positionnement de la ligne de seuil.....	12
c) Validation de l'essai	13
d) Interprétation des résultats	14
VII. INDEX DES SYMBOLES.....	15

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
2018-11	NF561-01	N/A	Première publication

I. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ MS-H DIVA FAST TIME permet de détecter et de différencier l'ADN des souches terrains de *Mycoplasma synoviae* et la souche vaccinale MS-H par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon de volaille.

2. 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™ MS-H DIVA FAST TIME peut détecter simultanément

- *M. synoviae* souches terrains (sonde marquée en FAM)
- MS-H souche vaccinale (sonde marquée en Cy5)
- Un contrôle interne d'amplification spécifique d'ADN exogène (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). 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
Ecouvillon sur animaux vivants (trachéal, fente palatine...)	<input checked="" type="checkbox"/>	6
Ecouvillon sur animaux morts (organes lésés, articulations...)	<input checked="" type="checkbox"/>	6
Culture bactérienne (solide, liquide)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Carte FTA	<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

REF	ADI561-100		
A5	solution d'amplification	2 x 500 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
MS CTL+	contrôle positif <i>M. synoviae</i> souches terrains	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
MS-H CTL+	contrôle positif vaccin MS-H	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Amp	contrôle exogène non cible d'amplification	1 x 150 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)
Une notice téléchargeable sur www.biox.com			

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 décongélations.

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 « MS-H CTL+ »

« MS-H CTL+ » est un témoin positif d'amplification.

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « MS-H CTL+ » et vortexer au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

Pour chaque analyse, utiliser 5 µl de « MS-H CTL+ » dans un des puits.

4. Utilisation du « MS CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** d'eau Nuclease-free au « MS CTL+ » et vortexer au moins 20 secondes. Aliquoter cette solution par 6 ou 12 µl et conserver à <-15°C.

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

5. Utilisation du « EPC-Amp » :

L'EPC-Amp est utilisé quand une technique autre que l'extraction ADIAPURE™ SLB est appliquée (par exemple après l'extraction d'ADN en colonnes de silice).

Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C en fonction de la taille des séries de PCR. **Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.**

Pour chaque réaction PCR, nous recommandons d'ajouter **0,5 µl « EPC-Amp » pour 10 µl du « A5 ».**

6. 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
- 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
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free
- Eau peptonée 2%
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/l)

- Kit d'extraction en lyse directe

- ADIAPURE™ SLB (Bio-X Diagnostics; 500 ml : ADIADP01S1-500)
- ADIAPURE™ SLB (Bio-X Diagnostics; 100 ml : ADIADP01S1-100)

- Kit d'extraction d'ADN en colonne de silice individuelle

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, 50 tests : réf. 51304 ou 250 tests : réf. 51306)

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 Adiagène, Qiagen. 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 à +2/8°C pendant 48 heures. Au-delà, 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.

3. 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'étape d'amplification, quelles que soient les matrices, est validée grâce à la combinaison des témoins inclus dans le kit Adiagène.

- Le contrôle exogène non cible d'amplification (EPC-Amp) ajouté dans le réactif A5 vérifie l'amplification de chaque échantillon. (Si extraction ADN autre que le kit ADIAPURE™ SLB)
- Le contrôle exogène non cible d'extraction (inclus dans le tampon L3 du kit ADIAPURE™ SLB) ajouté dans le réactif A5 vérifie les étapes d'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Les témoins « CTL+ » valident l'amplification des 2 cibles.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés.

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

Intégrer au moins un témoin négatif dans chaque série d'extraction pour s'assurer de l'absence d'inter-contamination. 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 *Mycoplasma synoviae* et/ou d'un vaccin MS-H. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *Mycoplasma synoviae* et/ou de vaccin MS-H. 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.

IV. Extractions et purifications

1. Extraction avec le kit ADIAPURE™ SLB

a) Réactifs fournis dans le kit

REF ADIADP01S1-100		
L1	tampon de lyse	1 x 100 ml flacon (Réactif prêt à l'emploi)
L3	tampon de lyse	1 x 5 ml flacon (Réactif prêt à l'emploi)
<hr/>		
REF ADIADP01S1-500		
L1	tampon de lyse	5 x 100 ml flacons (Réactif prêt à l'emploi)
L3	tampon de lyse	1 x 25 ml flacon (Réactif prêt à l'emploi)

Dès réception du kit, le tampon L3 doit être aliquoté et placé à **+2/8°C** ou à **<-15°C**.



Vortexer le tampon avant utilisation.

Le tampon L1 doit être stocké à température ambiante et à l'abri de la lumière. Il peut former un précipité, dans ce cas, le réchauffer jusqu'à dissolution complète du précipité avant utilisation.

Ne pas mélanger les réactifs de kits de lots différents.

b) Protocole

Couper **1 à 6 écouvillons** au ras du coton dans un tube à hémolyse de 5 ml.

Ajouter **1 ml de tampon L1** s'il s'agit d'une analyse de 1 à 3 écouvillons

ou 2 ml de tampon L1 s'il s'agit d'une analyse de 4 à 6 écouvillons.

Vortexer vigoureusement 10 secondes / tube.

NB : Les écouvillons dans le tampon L1 sont stables à température ambiante pendant 48h, au-delà stocker à <-15°C.

Transférer **50 µl** de surnageant dans un microtube ou dans un puits de plaque PCR, contenant **50 µl de tampon L3 préalablement vortexé.**

Faire des aspirations/refoulements ou vortexer le mélange.

Mettre un film sur la plaque avant l'incubation.

Incuber **15 minutes à +95°C** dans un bloc chauffant ou dans un thermocycleur.

Laisser refroidir, afin d'assurer l'exactitude du pipetage.

En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue peut être conservée à +2/8°C pendant 48 heures, au-delà stocker à <-15°C.

Poursuivre directement par l'amplification en §V.

2. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit

a) Préparation des échantillons

1) À partir d'écouvillons

Remarque : il est préférable de traiter individuellement les écouvillons d'autopsie très souillés.

Possibilité N°1

Placer **1 écouvillon** ou vortexer successivement jusqu'à **3 écouvillons** dans un microtube contenant **180 µl de tampon ATL** et **20 µl de protéinase K**.

NB : si les écouvillons ont été peu ou pas humidifiés, ils vont absorber l'ensemble du réactif. Dans ce cas, doubler la quantité de tampon de lyse.

Vortexer.

Essorer l'écouvillon contre le bord du tube pour recueillir le maximum de tampon.

Cf. § IV 2b pour l'extraction et la purification des ADN.

Possibilité N°2

Couper 1 à 3 écouvillons au ras du coton dans un tube (par exemple, tube à hémolyse de 5 ml) contenant **700 µl d'eau physiologique**.

Vortexer ~10 secondes.

Transférer **200 µl de surnageant** dans un microtube contenant **180 µl de tampon ATL** et **20 µl de protéinase K**.

Vortexer.

Cf. § IV 2b pour l'extraction et la purification des ADN.

NB : les écouvillons en eau physiologique peuvent être stockés à +2/8°C.

2) 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 un microtube contenant **180 µl de tampon ATL** et **20 µl de protéinase K**.

Vortexer ~5 secondes.

Essorer l'écouvillon contre le bord du tube pour recueillir le maximum de tampon.

Cf. § IV 2b pour l'extraction et la purification des ADN.

3) À partir de culture liquide

Centrifuger (20 minutes à 10 000 g) entre **100 à 500 µl de culture** dans un microtube.

Jeter le surnageant.

Ajouter au culot **180 µl de tampon ATL** et **20 µl de protéinase K**.

Vortexer.

Cf. § IV 2b pour l'extraction et la purification des ADN.

4) À partir de carte FTA

Couper 1 cm² de la carte FTA et introduire les morceaux dans un tube adapté.

Ajouter **1 ml d'eau physiologique**

Incuber 1 nuit à température ambiante.

Transférer **200 µl de surnageant** dans un microtube contenant **180 µl de tampon ATL** et **20 µl de protéinase K**.

Vortexer.

Cf. § IV 2b pour l'extraction et la purification des ADN.

a) Protocole

Toutes les centrifugations sont réalisées à température ambiante.

	Ecouvillon / Cuture / Carte FTA
Préparation des échantillons	Cf IV 2.a
Lyse	Incuber 15 minutes à +56°C .
	Ajouter 200 µl de tampon AL . 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^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW1 . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.
2^{ème} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon AW2 . 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 AE . Incuber ~1 minute 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.

V. Amplification

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

b- Décongeler le réactif « A5 » à température ambiante. Vortexer. Préparation de la solution d'amplification « A5 » :

Si extraction en ADIAPURE™ SLB :

Répartir **10 µl** de réactif « A5 » dans chacun des tubes PCR ou puits de plaque PCR.

Si extraction autre que ADIAPURE™ SLB :

Placer (n+1)***10 µl** de réactif « A5 » dans un microtube.

Y ajouter (n+1)***0,5 µl** « EPC-Amp ».

Répartir **10 µl** du mélange dans chacun des tubes PCR ou puits de plaque PCR.

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 **10 µl** de réactif « A5 ».

Pour les CTL+, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3. ou § II.4.) aux **10 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. Eliminer 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 *Mycoplasma synoviae* souches terrains est lue en FAM. La cible du vaccin MS-H est lue en Cy5. 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 (à 60°C).

Le programme suivant a été développé pour les appareils **ABI Prism** (type ABI7500, Step-one, QS5...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour les **MX3005P**, **AriaMx** d'Agilent et pour le **CFX96** de Biorad :

Programme standard		Programme court	
2 min 50°C 10 min 95°C		2 min. 95°C	
15 sec	45 cycles	5 sec 95°C	45 cycles
1 min		30 sec 60°C *	

*Mettre 32 secondes pour le ABI7500

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

VI. Interprétation des résultats

1. Définitions

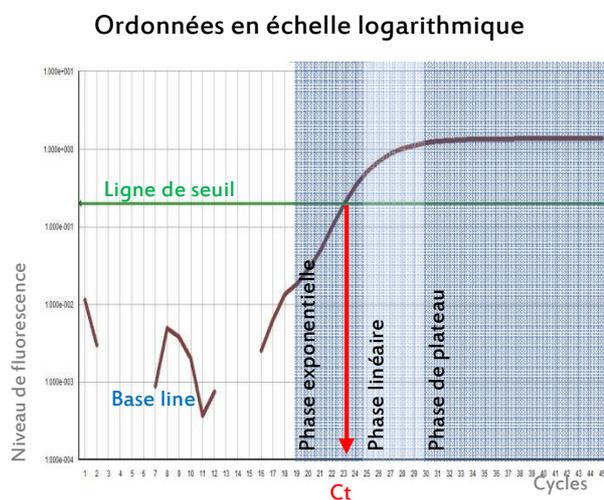
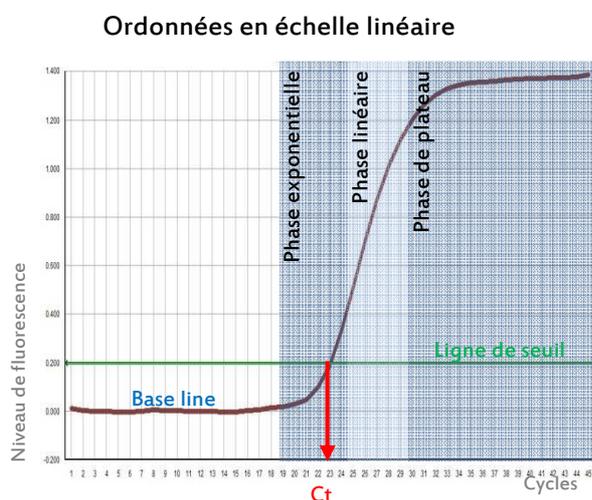
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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 :



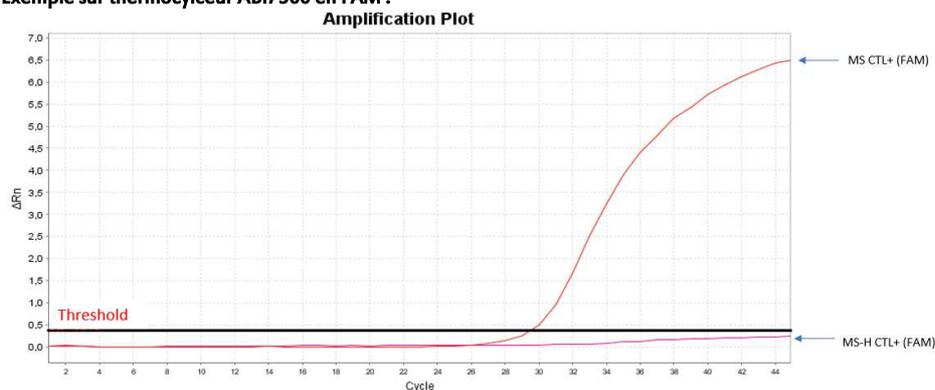
2. Validation et interprétation des résultats

b) Positionnement de la ligne de seuil

Afficher les courbes obtenues avec les « MS CTL+ » et « MS-H CTL+ » en FAM.

La ligne de seuil doit être positionnée manuellement. En échelle linéaire du FAM, une forte augmentation du niveau de fluorescence est attendue sur le « MS CTL+ ». Sur certains thermocycleurs, il est parfois possible d'observer une hauteur de fluorescence proche du bruit de fond sur le « MS-H CTL+ ». Dans ce cas, positionner la ligne seuil juste au dessus de la fluorescence du « MS-H CTL+ » comme ci-après.

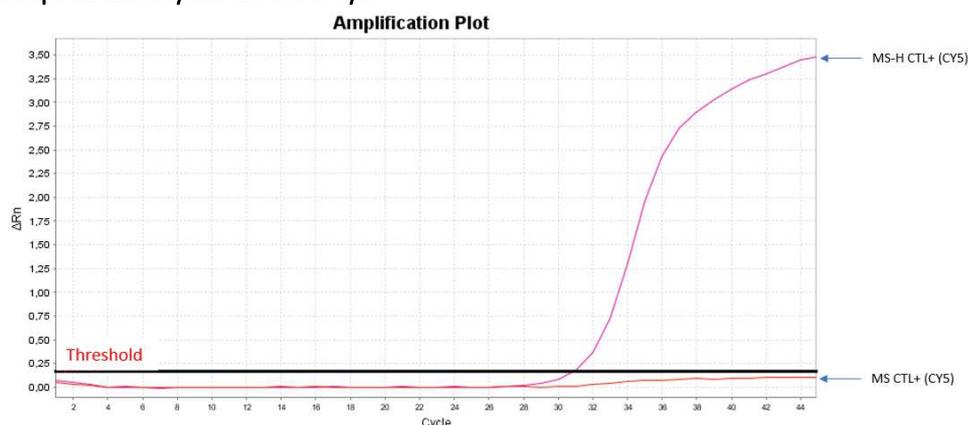
Exemple sur thermocycleur ABI7500 en FAM :



Afficher les courbes obtenues avec les « MS CTL+ » et « MS-H CTL+ » en Cy5.

La ligne de seuil doit être positionnée manuellement. En échelle linéaire du Cy5, une forte augmentation du niveau de fluorescence est attendue sur le « MS-H CTL+ ». Sur certains thermocycleurs, il est parfois possible d'observer une hauteur de fluorescence proche du bruit de fond sur le « MS CTL+ ». Dans ce cas, positionner la ligne seuil juste au dessus de la fluorescence du « MS CTL+ » comme ci-après.

Exemple sur thermocycleur ABI7500 en Cy5 :



c) Validation de l'essai

Afficher l'ensemble des courbes de la plaque en FAM, Cy5 et VIC/HEX pour interpréter les résultats. L'amplification est **valide** si les résultats suivants ont été obtenus pour les témoins :

Témoins		Témoin réactif (NTC)	Témoin positif d'amplification (MS-H CTL+)	Témoin positif d'amplification (MS CTL+)	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction *
Amplification FAM		non	non	oui	non	oui
Amplification Cy5		non	oui	non	non	oui
Amplification VIC/HEX	Si EPC-Amp non ajouté au mix	non	non	non	oui	oui
	Si EPC-Amp ajouté au mix	oui	oui	oui	oui	oui
Validation de		Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible du vaccin MS-H	Amplification de la cible <i>M. synoviae</i> souches terrains	Absence de contamination pour l'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM, Cy5 et VIC/HEX pour les témoins positifs (« CTL+ ») sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

d) 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 *M. synoviae* souches terrains (FAM), en MS-H souche vaccinale (Cy5) ou en contrôle interne (VIC/HEX).

Exemple	A	B	C	D	E
Amplification FAM	Non	Oui	Non	Oui	Non
Amplification Cy5	Non	Non	Oui	Oui	Non
Amplification VIC/HEX	Oui	Oui/Non	Oui/Non	Oui/Non	Non
Résultat	Non détecté	Détecté en <i>M. synoviae</i> souche terrain	Détecté en MS-H souche vaccinale	Détecté en <i>M. synoviae</i> souche terrain et MS-H souche vaccinale	Interprétable A refaire

L'échantillon est considéré comme **Non Détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en VIC ou HEX sans qu'il y ait de courbe d'amplification caractéristique en FAM et en Cy5 (exemple A).

L'échantillon est considéré comme **Détecté** si une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM (exemples B et D) et/ou en Cy5 (exemples C et D). Le Contrôle Interne peut être co-amplifié.

L'absence totale de courbe d'amplification caractéristique pour un échantillon (exemple E) 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.

VII. Index des symboles

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusque
	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.