

## ADIAVET™ CHLAM.A. REAL TIME

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

Référence :  
418024 (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.

Version française

NF212-05

2022/02

# ADIAVET™ CHLAM.A. 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>Chlamydia abortus</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 « CHLAM.A CTL+ » .....                          | 5         |
| 4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit .....          | 5         |
| <b>III. PRECONISATIONS AVANT L'ANALYSE DES ECHANTILLONS</b> ..... | <b>7</b>  |
| 1. Précautions.....                                               | 7         |
| 2. Conservation des échantillons et des extraits d'ADN.....       | 7         |
| 3. Préparation des prélèvements .....                             | 7         |
| 4. Préparation des témoins .....                                  | 7         |
| <b>IV. EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS</b> .....                     | <b>9</b>  |
| 1. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit.....               | 9         |
| 2. Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue .....                | 10        |
| 3. Extraction avec le kit ADIAMAG.....                            | 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        | NF212-01  | N/A                    | Première publication                                                   |
| 2016/07        | NF212-02  | Administratif          | Modification des logos                                                 |
| 2016/07        | NF212-02  | Administratif          | Ajout des exigences légales Biosearch                                  |
| 2016/07        | NF212-02  | Administratif          | Ajout tableau « Types de prélèvements » §I.3                           |
| 2016/07        | NF212-02  | Correction             | Modification <i>Chlamydia</i> par <i>Chlamydophila</i>                 |
| 2020/01        | NF212-03  | Modification technique | Ajout d'un tube d'eau dans le kit                                      |
| 2020/01        | NF212-03  | Correction             | Remplacement <i>Chlamydopila</i> par <i>Chlamydia</i>                  |
| 2021/04        | NF212-04  | Modification technique | §II.3 : Préparation CTL+                                               |
| 2021/04        | NF212-04  | Administratif          | §II.4 : Ajout du kit extraction ADIAMAG XL et du kit LD <sub>PCR</sub> |
| 2022/02        | NF212-05  | Modification technique | Ajout matrice liquide stomacal d'avorton                               |

## I. Informations générales

---

### 1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ CHLAM.A. REAL TIME permet de détecter *Chlamydia abortus* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon et de prélèvement de tissu de bovin, d'ovin, de caprin et d'équin, ainsi qu'à partir de prélèvement de lait de bovin, d'ovin et de caprin et de liquide stomacal d'avorton

### 2. *Chlamydia abortus*

*Chlamydia abortus* est une bactérie intracellulaire, présentant un tropisme pour le placenta des ruminants (bovins, caprins et ovins). Elle est responsable d'avortements (avortement enzootique des petits ruminants) et de mortalités néonatales. Chez la femme, quelques cas d'avortements ont été décrits. Plus rarement, cette espèce a été mise en cause lors d'avortements chez des juments, des carnivores, des lapines, des truies, des souris et des cobayes. Les signes cliniques dus à *C. abortus* ne permettent pas de poser un diagnostic de certitude. Les *Chlamydia* ne se multiplient pas en dehors des cellules eucaryotes leur isolement n'est pas réalisé en routine. Le diagnostic de laboratoire le plus souvent mis en œuvre est une analyse bactérioscopique d'une empreinte de placenta. Le manque de sensibilité et de spécificité de cette technique a conduit à la mise au point de tests PCR.

### 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™ CHLAM.A. REAL TIME peut détecter simultanément

- *Chlamydia abortus* (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 (Bio-X Diagnostics, 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                |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Ecouvillon (placentaire, vaginal...) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tissu (placenta, tissus fœtaux...)   | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Lait                                 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Liquide stomacal d'avorton           | <input checked="" type="checkbox"/> |

## II. Matériel et réactifs

---

### 1. Réactifs fournis dans le kit

|                          |                                           |                                                            |
|--------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>REF 418024 (100R)</b> |                                           |                                                            |
| A5 .....                 | solution d'amplification                  | 2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi) |
| CHLAM.A CTL+ .....       | contrôle positif <i>Chlamydia abortus</i> | 1 tube à bouchon violet (A reconstituer)                   |
| NF-Water .....           | Eau Nuclease free                         | 1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi) |

### 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 « CHLAM.A CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** "NF-Water" au « CHLAM.A CTL+ » et vortexer au moins 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.

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

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

### 4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

**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
- Lames de scalpel
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free
- Tampon PBS

**- Kit d'extraction d'ADN en colonne de silice 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'ARN/ADN en billes magnétiques sur automate**

- ADIAMAG (Bio-X Diagnostics, 200 tests : réf. NADI003 ; 800 tests : réf. NADI003-XL)

- Réactif complémentaire disponible pour l'adoption de méthode et de PCR (AFNOR NF U47-600)  
:
- ADIAVET™ LD<sub>PCR</sub> Positive Control – C. abortus (Réf. 418024-LD). Confirmation des performances – LD<sub>PCR</sub> du kit ADIAVET™ CHLAM.A. REAL TIME (sur demande).

### 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 Bio-X Diagnostics, 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.

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

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

#### 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 vérifie l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « CHLAM.A CTL+ » valide l'amplification de la cible.

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 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 *C. abortus*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *C. abortus*. 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                                              | Lait, liquide stomacal                      |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Préparation de l'échantillon                     | Vortexer l'écouvillon dans <b>1 ml</b> de <b>tampon PBS 1X</b> .<br>Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube.                                                                                                                                                                                          | Peser <b>20 à 30 mg</b> de tissu dans un microtube | Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube. |
| Lyse                                             | Ajouter <b>180 µl</b> de <b>tampon ATL</b> et <b>20 µl</b> de <b>protéinase K</b> . Vortexer.<br>Incuber <b>30 minutes</b> à <b>+70°C</b> (ou <b>1 nuit</b> à <b>+56°C</b> ).                                                                                                                            |                                                    |                                             |
|                                                  | Ajouter <b>200 µl</b> de <b>tampon AL</b> . Vortexer.<br>Incuber <b>10 minutes</b> à <b>+70°C</b> .                                                                                                                                                                                                      |                                                    |                                             |
| Préparation de la fixation                       | Ajouter <b>200 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> .<br>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 <b>la totalité</b> de chaque échantillon sur une colonne.<br>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.<br><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 <b>500 µl</b> de <b>tampon AW1</b> .<br>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.                                                                                                                                                                                           |                                                    |                                             |
| 2 <sup>ème</sup> lavage                          | Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW2</b> .<br>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.                                                                                                                                                                                           |                                                    |                                             |
| Séchage de la colonne                            | Changer le tube collecteur.<br>Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.                                                                                                                                                                                                                                         |                                                    |                                             |
| Elution                                          | Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>200 µl</b> de <b>tampon AE</b> .<br>Incuber ~1 minute à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.                                                                                                                                      |                                                    |                                             |
| Conservation                                     | Fermer les tubes, identifier et conserver à <b>+2/8°C</b> pendant 24 heures, puis à <b>&lt;-15°C</b> .                                                                                                                                                                                                   |                                                    |                                             |

## 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 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                                              | Lait, liquide stomacal                      |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Préparation de l'échantillon                     | Vortexer l'écouvillon dans <b>1 ml</b> de <b>tampon PBS 1X</b> .<br>Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube.                                                                                                                                                                                           | Peser <b>20 à 30 mg</b> de tissu dans un microtube | Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube. |
| Lyse                                             | Ajouter <b>180 µl</b> de <b>tampon T1</b> et <b>25 µl</b> de <b>protéinase K</b> . Vortexer.<br>Incuber <b>30 minutes</b> à <b>+70°C</b> (ou <b>1 nuit</b> à <b>+56°C</b> ).                                                                                                                              |                                                    |                                             |
|                                                  | Ajouter <b>200 µl</b> de <b>tampon B3</b> . Vortexer.<br>Incuber <b>10 minutes</b> à <b>+70°C</b> .                                                                                                                                                                                                       |                                                    |                                             |
| Préparation de la fixation                       | Ajouter <b>200 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> .<br>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 <b>la totalité</b> de chaque échantillon sur une colonne.<br>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.<br><i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposée 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 <b>500 µl</b> de <b>tampon BW</b> .<br>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.                                                                                                                                                                                             |                                                    |                                             |
| 2 <sup>ème</sup> lavage                          | Changer le tube collecteur et ajouter <b>600 µl</b> de <b>tampon B5</b> .<br>Centrifuger 1 minute à 10 000 g.                                                                                                                                                                                             |                                                    |                                             |
| Séchage de la colonne                            | Changer le tube collecteur.<br>Centrifuger 3 minutes à 10 000 g.                                                                                                                                                                                                                                          |                                                    |                                             |
| Elution                                          | Transférer la colonne sur un microtube. Déposer <b>200 µl</b> de <b>tampon BE</b> .<br>Incuber ~1 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 10 000 g.                                                                                                                                      |                                                    |                                             |
| Conservation                                     | Fermer les tubes, identifier et conserver à <b>+2/8°C</b> pendant 24 heures, puis à <b>&lt;-15°C</b> .                                                                                                                                                                                                    |                                                    |                                             |

## 3. Extraction avec le kit ADIAMAG

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. 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 *Chlamydia abortus* 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. Interprétation des résultats

### 1. Définitions

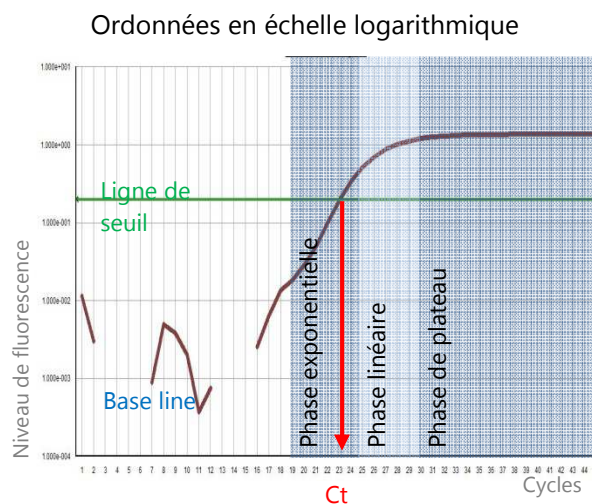
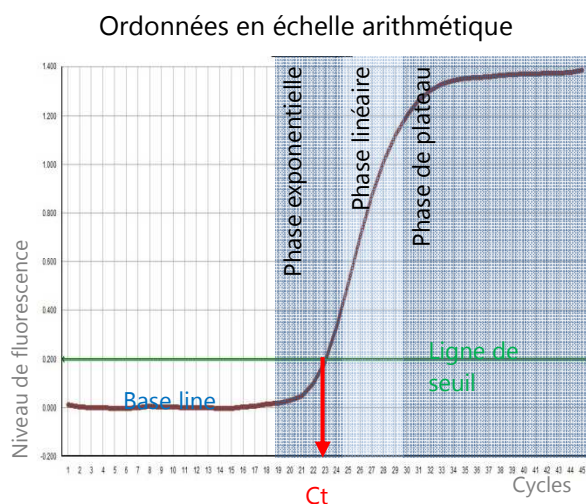
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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

*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 *Chlamydia abortus* (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<br>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.