



ADIAVET™ CEMO TAYLORELLA REAL TIME

TEST POUR LA DETECTION DE
TAYLORELLA EQUIGENITALIS ET *TAYLORELLA ASINIGENITALIS*
PAR AMPLIFICATION ENZYMATIQUE DE GENE EN TEMPS REEL (TEST PCR)

Références :

ADI501-100 (100 réactions)

ADI501-500 (500 réactions)

Kits développés et validés en collaboration avec



Pôle d'analyses et de recherche
de Normandie



ADIAVET™ CEMO TAYLORELLA REAL TIME

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	But de l'essai	4
2.	Taylorella	4
3.	Description et principe du test.....	5
III.	MATERIEL ET REACTIFS.....	6
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	6
2.	Validité et conservation.....	6
3.	Utilisation du « TAY CTL+ ».....	6
4.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit	6
IV.	PRECONISATIONS AVANT L'ANALYSE DES ECHANTILLONS.....	8
1.	Précautions.....	8
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ADN.....	8
3.	Préparation des prélèvements	8
4.	Préparation des témoins.....	9
V.	EXTRACTIONS ET PURIFICATIONS.....	10
1.	Extraction sans purification à partir d'écouvillon	10
2.	Extraction à partir de culture bactérienne.....	10
3.	Extraction avec le kit Billes magnétiques ADIAMAG.....	10
4.	Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit.....	11
5.	Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue	12
VI.	AMPLIFICATION.....	13
VII.	INTERPRETATION DES RESULTATS.....	14
1.	Définitions.....	14
2.	Validation et interprétation des résultats.....	14
A.	Validation de l'essai.....	14
B.	Interprétation des résultats.....	15
VIII.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	16
IX.	INDEX DES SYMBOLES.....	17

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 mise en page, ne figurent pas l'historique des révisions

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2016/07	NF501-01	N/A	Première publication
2017/03	NF501-02	Modification technique	Change PBS par PBS 1X ; § IV-1-a
2017/10	NF501-03	Correction	Ajout référence du kit en 500 réactions (ADI501-500) Ajout protocole d'extraction bille magnétiques ADN/ARN Validation et interprétation des résultats ; § VI-2
2018/01	NF501-04	Correction	Modification de l'interprétation des résultats dans le cas d'un échantillon inhibé ou potentiellement inhibé (§VI-2-b)
2019/09	NF501-05	Correction	Ajout du pH=7.4 et modification de la composition du PBS
2020/01	NF501-05	Technique	Ajout d'un tube d'eau
2020/01	NF501-05	Administratif	Modification §III. 4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ CEMO TAYLORELLA REAL TIME permet de détecter *Taylorella equigenitalis* et *Taylorella asinigenitalis* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon et de semence d'équin et de culture bactérienne.

2. Taylorella

La métrite contagieuse équine (Contagious equine metritis ou CEM) est une maladie inflammatoire du tractus génital de la jument provoquée par *Taylorella equigenitalis* (OIE 2012). L'infection de la jument peut être symptomatique ou asymptomatique (Timoney, 2011). Les juments infectées peuvent ou non présenter une excrétion bactérienne vaginale intermittente au cours de la gestation. Certains de ces cas peuvent développer une infection placentaire. L'avortement, à environ 7 à 8 mois de gestation, est une suite très rare de l'infection.

Les étalons ne sont pas strictement infectés par *T. equigenitalis* puisque la bactérie est associée à la flore commensale du smegma et colonise seulement les sites de prédilection dans les organes génitaux externes sans provoquer de réponse immunitaire ou de signe clinique (Schulman et al., 2013).

Les juments porteuses et les étalons reproducteurs agissent comme des réservoirs de *T. equigenitalis*, mais les étalons, parce qu'ils s'accouplent avec de nombreuses juments, jouent un rôle beaucoup plus important dans la dissémination de la bactérie (OIE, 2012).

CEM est une maladie notifiée à l'OIE dont le diagnostic est normalisé (Chapitre 2.5.2. du manuel terrestre de l'OIE (2012) Norme AFNOR U47-108).

Une autre espèce de *Taylorella*, *Taylorella asinigenitalis*, a été isolée à partir d'ânes, de juments et d'étalons aux Etats-Unis et en Europe.

L'endométrite peut également être due à d'autres bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (OIE, 2012) (cf. ADIAVET™ CEMO KLEB/PSEUDO REAL TIME).

CEM est diagnostiqué par l'écouvillonnage du tractus génital de la jument et de l'étalon. L'écouvillon est envoyé au laboratoire de diagnostic en milieu de transport Amies avec du charbon. Cette condition d'expédition permet la protection de *T. equigenitalis* et de *T. asinigenitalis* qui sont des bactéries sensibles à l'oxygène.

Les *Taylorella* sont des coccobacilles, à Gram négatif, microaerophile, non mobiles. Leur isolement nécessite des milieux enrichis et les boîtes d'isolement doivent être régulièrement observées pendant au moins 7 jours (OIE, 2012, norme AFNOR U47-108).

La sérologie a une application limitée et la séroconversion est rapportée comme une caractéristique transitoire associée à l'endométrite aiguë chez la jument, et absent chez les étalons (Schulman et al., 2013).

Des tests de PCR en temps réel pour la détection rapide, sensible et spécifique pour *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis* directement à partir de prélèvements génitaux sans besoin d'isolement bactérien supplémentaire ont été développés. L'augmentation de la sensibilité et la spécificité de la PCR permet d'éviter des faux négatifs possibles en culture (Schulman et al., 2013).

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™ CEMO TAYLORELLA REAL TIME peut détecter simultanément

- *T. equigenitalis* (sonde marquée en FAM)
- *T. asinigenitalis* (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 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	☒
Semence	☒
Culture bactérienne	☒

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADI501-100

A5 solution d'amplification
TAY CTL+ contrôle positif *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis*
NF-Water Eau Nuclease free

2 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

REF ADI501-500

A5 solution d'amplification
TAY CTL+ contrôle positif *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis*
NF-Water Eau Nuclease free

10 x 1000 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
1 x 1000 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'aliqoter 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 « TAY CTL+ »

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

Ajouter **200 "NF-Water"** au « TAY CTL+ » et vortexer au moins 20 secondes.

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

Pour chaque analyse, utiliser 5 µl de « TAY 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, plaque 96
- 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 ml
- Plaque 96 puits (capacité > 200 µl)
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Ethanol 96-100%
- Eau nuclease-free

- Tampon PBS 1X (composition recommandée, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, KH₂PO₄ 1,7mM, sans Ca²⁺, sans Mg²⁺ - une composition différente peut être utilisée après validation par l'utilisateur) pH=7,4

- Kits d'extraction d'ADN :
 - **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**
 - ADIAMAG (Bio-X Diagnostics ; 200 extractions : réf. NADI003).
- Kits complémentaires disponibles pour l'adoption de méthode et de PCR (AFNOR NF U47-600) :
 - ADIAVET™ TAY Extraction Positive Control (Réf. : ADI501-8). (Matériel de référence fournisseur pour adoption de méthode pouvant également être utilisé comme sentinelle).
 - ADIAVET™ LDpcr Positive Control – TAY (réf. : ADI501-LD) (Confirmation des performances – LDpcr du kit ADIAVET™ TAYLLORELLA REAL TIME).

IV. 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

La détection de CEM Organisme (CEMO) se fait préférentiellement par écouvillonnage. Les *Taylorella* étant des bactéries sensibles à l'oxygène, les écouvillons sont placés dans des gaines contenant du milieu de transport Amies complémenté de charbon pour permettre leur survie, ainsi le diagnostic par culture dans les 48 heures après le prélèvement.

L'analyse PCR ne nécessitant pas que les bactéries soient viables, l'écouvillon peut être placé dans une gaine avec ou sans milieu de transport. Ces écouvillons peuvent être utilisés en PCR jusqu'à 7 jours conservés à température ambiante (entre 18 et 25°C). Ils peuvent également être stockés à +2/8°C pour éviter la multiplication de la flore bactérienne dans la gaine de transport.

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

- Le contrôle interne présent dans le réactif A5 vérifie l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « TAY 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).

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

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *T. equigenitalis* et *T. asinigenitalis*. 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.

ADIAGENE peut fournir un témoin positif cible lyophilisé et calibré entre 1 et 100xLD méthode. (ADIAVET™ TAY Extraction Positive Control Réf. : ADI501-8).
Ce témoin, ajouté à une matrice négative, peut être utilisé comme sentinelle ou après dilution, comme NED fournisseur pour adopter la méthode.

V. Extractions et purifications

1. Extraction sans purification à partir d'écouvillon

- A. Placer 500 µl de tampon PBS 1X dans un tube de 5 ml.
- B. Ajouter l'écouvillon.
- C. Agiter.
- D. Replacer l'écouvillon dans sa gaine.
- E. Transférer 100 µl de la suspension obtenue dans un puits de plaque 96 puits ou un microtube.
- F. Fermer (par exemple avec un film adhésif pour la plaque 96 puits).
- G. Incuber 10 minutes à 95°C (par exemple dans un bloc chauffant, thermocycleur).
- H. Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs (par exemple, 15-30 minutes à température ambiante (entre 18 et 25°C) ou 5-20 minutes +2/8°C, selon le nombre d'échantillons analysés).

Note : En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution d'acide nucléique obtenue individuellement peut être conservée à +2/8°C pendant 24 heures puis à une température inférieure à -15°C.

2. Extraction à partir de culture bactérienne

Mettre 100 µl d'eau Nuclease-free dans un microtube.

Transférer une ou des colonies dans le microtube.

NB : transférer trop d'échantillon peut être inhibiteur de la PCR.

Incuber **10 minutes à 95°C.**

Laisser refroidir.

Conserver à +2/8°C quelques heures puis à <-15°C plusieurs mois.

3. Extraction avec le kit Billes magnétiques 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.

4. Extraction avec le kit QIAamp® DNA Mini kit

Toutes les centrifugations sont réalisées entre 18 et 25°C.

	Ecouvillon	Semence
Préparation de l'échantillon	Déposer 1 écouvillon dans un tube. Ajouter 500 µl de tampon PBS 1X . Agiter. Transférer 200 µl de surageant dans un microtube.	Déposer 200 µl dans un microtube
Lyse	Ajouter 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K . Vortexer. Incuber 30 minutes à +70°C (ou 1 nuit 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 .	

5. Extraction avec le kit NucleoSpin® Tissue

Toutes les centrifugations sont réalisées entre 18 et 25°C.

	Ecouvillon	Semence
Préparation de l'échantillon	Déposer 1 écouvillon dans un tube. Ajouter 500 µl de tampon PBS 1X . Agiter. Transférer 200 µl de surageant dans un microtube.	Déposer 200 µl dans un micurtube
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 ^{er} lavage	Changer le tube collecteur et ajouter 500 µl de tampon BW . Centrifuger 1 minute à 10 000 g.	
2 ^{ème} 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 .	

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 (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 *T. equigenitalis* est lue en FAM. La cible *T. asinigenitalis* 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 (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**, pour l'AriaMx d'Agilent, pour le **CFX96** et 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** d'Agilent :

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.

VII. Interprétation des résultats

1. Définitions

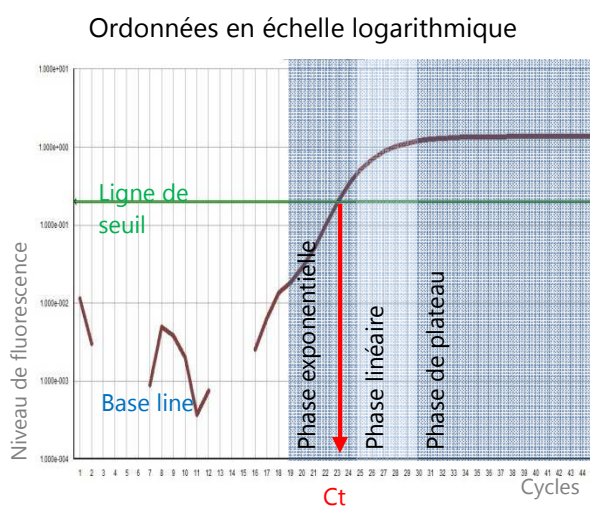
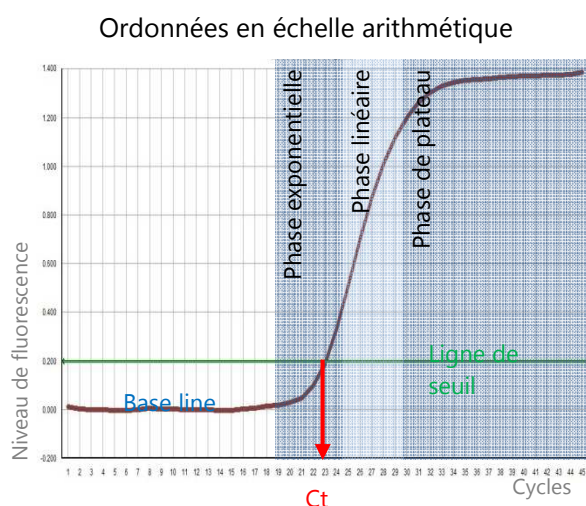
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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 et en CY5.

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	oui	oui/non	oui	oui/non
Amplification Cy5	non	oui	non	oui
Validation de	Absence de contamination pour l'amplification	Amplification des cibles	Absence de contamination pour l'extraction	Etapas d'extraction et d'amplification

* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM, Cy5 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 FAM, en Cy5 **et/ou** en contrôle interne (VIC/HEX).

Un échantillon **positif** montre une courbe d'amplification caractéristique et une valeur de Ct en FAM (*T. equigenitalis*) et/ou en Cy5 (*T. asinigenitalis*).

Note : Suivant le thermocycleur utilisé, il est important de regarder la compensation spectrale entre le fluoroforme FAM et VIC/HEX en particulier si les valeurs de Ct sont très précoces.

Statut de l'échantillon

			Statut	
Valeur Ct en HEX ou équivalent Contrôle interne	Valeur Ct en FAM <i>T. equigenitalis</i>	Valeur Ct en Cy5 <i>T. asinigenitalis</i>	<i>T. equigenitalis</i>	<i>T. asinigenitalis</i>
>36	≤45	≤45	*Inhibé ou potentiellement inhibé	*Inhibé ou potentiellement inhibé
≤36	≤36	≤36	DéTECTÉ	DéTECTÉ
		=45		Non détecté
		>36		DéTECTÉ, non reproductible
	=45	≤36	Non détecté	DéTECTÉ
		=45		Non détecté
		>36		DéTECTÉ, non reproductible
	>36	≤36	DéTECTÉ, non reproductible	DéTECTÉ
		=45		Non détecté
		>36		DéTECTÉ, non reproductible

* « Inhibé ou Potentiellement inhibé » :

- Dans le cas d'une absence de courbe d'amplification caractéristique et/ou valeur de Ct du contrôle interne supérieure à 36. Les causes possibles sont soit une PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme (se reporter au paragraphe « validation de l'essai »), absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) soit une déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).

Actions conseillées :

- 1- refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10ème en eau Nuclease-free ;
 - 2- refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.
- Un phénomène de compétition peut aussi survenir si l'échantillon est considéré comme détecté en cible *T. equigenitalis* et/ou *T. asinigenitalis* (Remarque : il n'est pas nécessaire de répéter l'analyse de l'échantillon, l'échantillon est considéré comme positif).

« **DéTECTÉ, non reproductible** » : l'échantillon est détecté au-delà de la limite de détection.

VIII. Références bibliographiques

Norme AFNOR NF U47-108 (décembre 2012), isolement et identification de *Taylorella equigenitalis* à partir de prélèvements génitaux d'équidés.

Norme AFNOR NF U47-600-2 (février 2015), Méthodes d'analyse en santé animale – PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale.

OIE Terrestrial Manual – 2012 – Contagious equine metritis – Chapter 2.5.2

Schulman M.L. May C. E, Keys B, Guthrie A. J. – 2013 - Contagious equine metritis: Artificial reproduction changes the epidemiologic paradigm – 167 :2-8

Timoney – 2011 - HORSE SPECIES SYMPOSIUM: Contagious equine metritis: An insidious threat to the horse breeding industry in the United States - J Anim Sci – 89: 1552-1560

IX. 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

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.



**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