

## ADIAVET™ CHLAM.SPP FAST TIME

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

Référence :

ADI611-100 (100 réactions)



# ADIAVET™ CHLAM.SPP FAST TIME

HISTORIQUE DES REVISIONS.....	3
<b>I. INFORMATIONS GENERALES.....</b>	<b>4</b>
1. But de l'essai .....	4
2. <i>Chlamydia</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 des contrôles fournis dans le kit.....	5
A. <i>Utilisation du « CHLAM.SPP CTL+ »</i> .....	5
B. <i>Utilisation de l'« EPC-Ext »</i> .....	5
C. <i>Utilisation de l'« EPC-Amp »</i> .....	5
4. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit.....	6
<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.....	8
<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 Billes magnétiques ARN/ADN.....	11
<b>V. AMPLIFICATION.....</b>	<b>12</b>
<b>VI. INTERPRETATION DES RESULTATS.....</b>	<b>13</b>
1. Définitions .....	13
2. Validation et interprétation des résultats.....	13
A. <i>Validation de l'essai</i> .....	14
B. <i>Interprétation des résultats</i> .....	14
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>15</b>
<b>VIII. INDEX DES SYMBOLES.....</b>	<b>16</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
2019/09	NF611-01	N/A	Première publication
2021/09	NF611-02	Technique	Ajout matrice liquide stomacal avorton

## I. Informations générales

---

### 1. But de l'essai

Le kit ADIAVET™ CHLAM.SPP FAST TIME permet de détecter les bactéries du genre *Chlamydia* par amplification enzymatique en temps réel (PCR) à partir d'écouvillon et de prélèvement de tissu (bovin, ovin, caprin, volaille, porc et autres espèces animales) ainsi qu'à partir de lait et de liquide stomacal d'avorton issu de ruminants.

### 2. *Chlamydia*

La famille des Chlamydiaceae ne comprend qu'un seul genre : *Chlamydia* (*C.*) regroupant 13 espèces : *C. abortus*, *C. avium*, *C. buteonis*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. ibidis*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. suis* et *C. trachomatis* (Sachse et al., 2014 ; Laroucau et al., 2019).

Ce sont des bactéries intracellulaires strictes qui peuvent induire en fonction des espèces animales infectées, des arthrites, de la conjonctivite, de la pneumonie, des avortements... Elles peuvent être à l'origine de zoonoses. Les *Chlamydia* peuvent également être détectés chez les chevaux, les carnivores, les lapins, les souris, les cochons d'inde ainsi que les reptiles et les poissons.

La culture des Chlamydiaceae n'est pas réalisée en routine ce qui rend leur diagnostic difficile. Le besoin de sensibilité et de spécificité lors du diagnostic des infections à *Chlamydia spp* 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.SPP FAST TIME peut détecter simultanément

- *Chlamydia* (sonde marquée en FAM)
- Un contrôle interne d'extraction et/ou d'amplification spécifique d'un 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 (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, cloacal, fécès, nasaux...)	<input checked="" type="checkbox"/>
Tissu (placenta, tissus fœtaux...)	<input checked="" type="checkbox"/>
Lait	<input checked="" type="checkbox"/>
Liquide stomacal avorton	<input checked="" type="checkbox"/>

## II. Matériel et réactifs

---

### 1. Réactifs fournis dans le kit

**REF** ADI611-100

A5 .....	solution d'amplification	2 x 500 µl tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
CHLAM.SPP CTL+ .....	contrôle positif <i>Chlamydia</i>	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Amp .....	contrôle exogène non cible d'amplification	1 x 150 µl tube à bouchon incolore (Réactif prêt à l'emploi)
EPC-Ext .....	contrôle exogène non cible d'extraction	2 x 300 µl tubes à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
NF-Water .....	Eau Nuclease free	1 x 1000 µl tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Une notice téléchargeable sur [www.biox.com](http://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 l'emploi.

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

### 3. Utilisation des contrôles fournis dans le kit

#### A. Utilisation du « CHLAM.SPP CTL+ »

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

Ajouter **200 µl** de **NF-Water** au tube **CHLAM.SPP CTL+** et vortexer au moins 20 secondes jusqu'à complète dissolution du culot bleu.

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

Pour chaque analyse, utiliser **5 µl** de **CHLAM.SPP CTL+** dans un des puits.

#### B. Utilisation de l'« EPC-Ext »

Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C en fonction de la taille des séries d'extraction.

Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

Pour chaque extraction, ajouter **5 µl** d'**EPC-Ext** par échantillon.

#### C. Utilisation de l'« EPC-Amp »

Aliquoter et conserver cette solution à <-15°C en fonction de la taille des séries d'extraction.

Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

En cas d'amplification d'ADN non extrait avec de l'EPC-Ext, nous recommandons d'ajouter **0,5 µl** d'**EPC-Amp** par échantillon dans le mix.

#### 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 1X

**- 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 KingFisher**

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

### 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 exogène non cible d'amplification, ajouté dans le réactif A5, vérifie l'amplification de chaque échantillon.
- Le contrôle exogène non cible d'extraction, ajouté dans le l'échantillon lors de l'extraction, vérifie les étapes d'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « CHLAM.SPP CTL+ » valide l'amplification de la cible (FAM).

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 *Chlamydia*. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution de *Chlamydia*. 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 :*

***Ils sont 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> . 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> + <b>20 µl</b> de <b>protéinase K</b> + <b>5 µl</b> <b>EPC-Ext</b> . Vortexer. 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. Incuber <b>10 minutes</b> à <b>+70°C</b> .		
Préparation de la fixation	Ajouter <b>200 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou au vortex (~15 secondes).		
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer <b>la totalité</b> de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>		
1 <sup>er</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon AW1</b> . 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> . 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 <b>200 µl</b> de <b>tampon AE</b> . 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 froter 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 1 ml de <b>tampon PBS 1X</b> . Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube.	Peser <b>20 à 30 mg</b> de tissu dans un microtube	Transférer <b>200 µl</b> dans un microtube.
Lyse	Ajouter <b>180 µl</b> de <b>tampon T1</b> + <b>25 µl</b> de <b>protéinase K</b> + <b>5 µl EPC-Ext</b> . Vortexer. 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. Incuber <b>10 minutes</b> à <b>+70°C</b> .		
Préparation de la fixation	Ajouter <b>200 µl</b> d' <b>éthanol 100%</b> . Homogénéiser par flux et reflux à la pipette (~10 fois) ou au vortex (~15 secondes).		
Transfert sur colonnes et fixation à la membrane	Identifier les colonnes, déposer <b>la totalité</b> de chaque échantillon sur une colonne. Centrifuger 1 minute à 10 000 g. <i>Si la totalité du mélange n'a pas pu être déposé en une seule fois sur la colonne, déposer le volume restant sur la colonne et centrifuger 1 minute à 10 000 g.</i>		
1 <sup>er</sup> lavage	Changer le tube collecteur et ajouter <b>500 µl</b> de <b>tampon BW</b> . 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> . 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 <b>200 µl</b> de <b>tampon BE</b> . 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 Billes magnétiques ARN/ADN

Se référer à la version de notice NFKF disponible sur le site web et 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. Préparation de la solution d'amplification « A5 » :

**Si ajout de l'EPC-Ext à l'extraction :**

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

**Si pas d'ajout de l'EPC-Ext à l'extraction :**

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

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

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

c- **Replacer 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 le CHLAM.SPP CTL+, ajouter **5 µl** de la solution (§ II.3.) aux **10 µl** de réactif « A5 ».

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

**Replacer 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 *Chlamydia* 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 à 60°C.

Les programmes suivants ont été développés pour les appareils **QuantiStudio 5, ABI Prism** (type 7500, Step-one...) d'**Applied Biosystems** (cocher l'option « emulation 9600 » lorsqu'elle existe), pour les **MX3005P** et **AriaMx** d'**Agilent**, les **LightCyclers** de **Roche Diagnostics** et pour le **CFX96** de **Biorad** :

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

\*Mettre 32 secondes pour le 7500 Thermofisher

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

## VI. Interprétation des résultats

### 1. Définitions

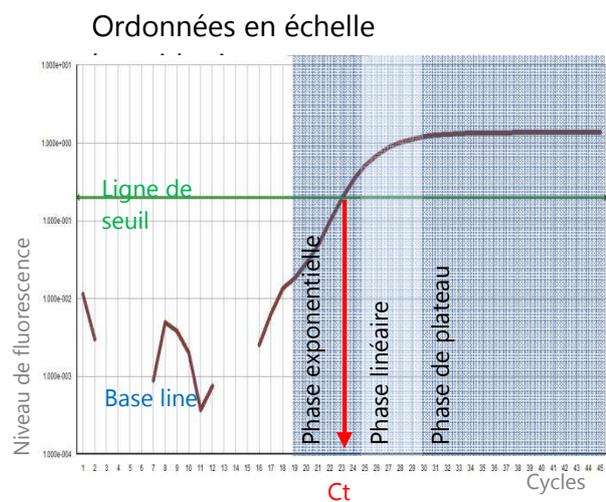
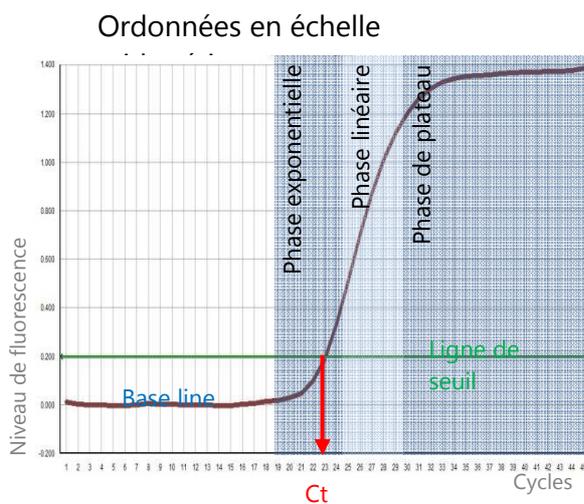
Le terme « **ligne de base** » ou « **base line** » correspond au bruit de fond de la fluorescence observé pendant les premiers cycles de l'amplification avant que la fluorescence augmente de façon significative.

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 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 (CHLAM.SPP CTL+)	Témoin négatif d'extraction	Témoin positif d'extraction*
Amplification FAM		non	oui	non	oui
Amplification HEX	Si EPC-Ext utilisé	non	non	oui	oui
	Si EPC-Amp utilisé	oui	oui	oui	oui
Validation de		Absence de contamination pour l'amplification	Amplification de la cible <i>Chlamydia</i>	Absence de contamination pour l'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification

\* optionnel

Les valeurs indicatives de Ct attendues en FAM et HEX pour le témoin positif (« CHLAM.SPP 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 (*Chlamydia*) ou en VIC/HEX (contrôle interne).

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

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

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

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

## VII. Références bibliographiques

---

K. Laroucau, F. Vorimore, R. Aaziz, L. Solmonson, R.C. Hsia, P.M. Bavoil, P. Fach, M. Hölzer, A. Wuenschmann, K. Sachse. *Chlamydia buteonis*, a new *Chlamydia* species isolated from a red-shouldered hawk. *Syst. Appl. Microbiol.* 2019

SACHSE K., LAROUCAU K., RIEGE K., WEHNER S., DILCHER M., CREASY HH., et al. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 2014, 37, 79-88.

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.

## 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 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.