

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit® Leptospires pathogènes

Cat. N° BIOTK046 - 50 réactions

**Détection des Leptospires pathogènes*
par PCR en temps réel (qPCR)
avec contrôle positif interne endogène (IPC)
et contrôle interne exogène (IC)**

TOUTES ESPECES

Types de prélèvements

- Mucus vaginal/endocervical, chez les ruminants cotylédons placentaires prélevés sur écouvillons secs, avec embout viscosse et tige souple en plastique
- Organes de fœtus : foie, rate et rein
- Sang total (sur tube EDTA) ‡
- Analyses individuelles ou en mélange jusqu'à 3 selon la matrice

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract® SuperBall® Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract® Column Cat. N° BEC050 ou BEC250 ; Qiagen -QIAamp® DNA mini kit Cat N°51304)

* Classification, établie par analyse phylogénétique des séquences ADN ribosomal. Pour plus d'informations sur les espèces reconnues par ce kit, consulter le dossier de validation.

‡ Matrice conseillée uniquement en phase aiguë d'infection, associée à des signes cliniques (anémie hémolytique avec plus ou moins d'ictère, chute de la production de lait, etc...)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® Leptospires pathogènes dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction de la gamme Repro détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions proposées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® Leptospires pathogènes, détaillant les différentes étapes de préparation de la qPCR.

Les dernières versions en vigueur de chacun des deux documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit® Leptospires pathogènes.

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® Leptospires pathogènes sont disponibles sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

GESTION DES REVISIONS

BioSellal indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous:

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	Aucun (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)	Aucun	Nouvelle adoption nécessaire
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

PRESENTATION

Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries, parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSellal recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

Prélèvements

Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

Envoi

Il est recommandé d'effectuer l'envoi au plus proche de la date de prélèvement, sous couvert du froid positif.

Conservation après réception

Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception ou congélation à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour quelques mois et à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ au-delà de 1 an.

Gamme Repro

Ce kit appartient à la gamme Repro qui regroupe un ensemble de kits dédiés à la détection de pathogènes responsables de troubles de la reproduction chez les ruminants et qui partagent des protocoles d'extraction et de PCR communs. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal de la gamme PIG et AVIAN (informations disponibles via contact@biosellal.com).

En plus des kits présents dans la gamme Repro, BioSellal propose des kits de PCR en temps réel permettant le diagnostic d'autres agents pathogènes potentiellement responsables d'avortement chez les ruminants tels que BVDV ou les kits de la gamme BLOOD. Pour toute information sur les autres kits disponibles contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

Description du Bio-T kit® Leptospires pathogènes

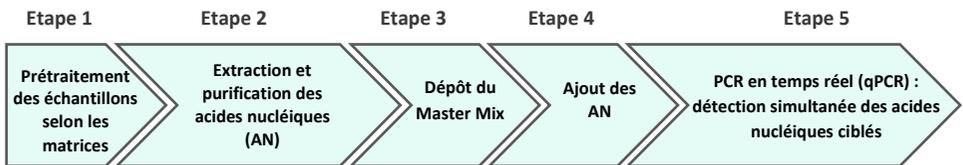
Le **Bio-T kit® Leptospires pathogènes** (Cat. N° BIOTK046) contient un **Master Mix prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- **Des Leptospires pathogènes (Lepto)** grâce à un marquage 6-FAM,
- **D'un contrôle positif endogène IPC (gapdh)**, grâce à un marquage VIC, qui permet de confirmer la présence de cellules de l'hôte en quantité suffisante, de valider l'intégrité des acides nucléiques dans l'échantillon et la qualité de l'extraction ainsi que l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.
- **D'un contrôle interne exogène IC** grâce à un marquage CY5, à ajouter, lors de l'extraction des acides nucléiques pour les espèces autres que les ruminants (canidés, équidés, suidés...) afin de valider la qualité de l'extraction des acides nucléiques et l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Ce kit, basé sur une détection qualitative des leptospires pathogènes (détecté non détecté) à partir de prélèvements de type mucus vaginal/encervical, cotylédons placentaires, organes de fœtus (foie, rate et rein) et sang, a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR** pour la partie PCR.

Les méthodes d'extraction proposées sont décrites dans le manuel d'extraction de la gamme **Repro**.

Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qPCR



Manuel d'extraction de la gamme Repro		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® Leptospires pathogènes		
Mucus vaginal/encervical, cotylédons placentaires*	BioExtract® SuperBall®	Master Mix prêt à l'emploi MMLepto-B	Echantillons NC/NCS	Détecteurs : FAM/VIC/Cy5
Organes de fœtus (foie, rein et rate)*	BioExtract® Column		Témoin positif de processus	Référence passive : ROX
Sang total	QIAamp® DNA mini kit		EPC (EPCLepto-B)	Programme : Classique ± RT PIG/AVIAN ± RT en ramping Standard ou Fast

* prétraitement obligatoire

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMLepto-B	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IC) exogène Contrôle d'amplification exogène	IPC-A	250 µl	tube bouchon rose Sachet B	≤-16°C Zone « Extraction »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification des Leptospires pathogènes	EPCLepto-B	110 µl	tube bouchon orange Sachet C	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet C	5°C ± 3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSella	ATL19076
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSella	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSella	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSella	BES384
QIAamp® DNA mini kit	Kit d'extraction ADN format colonne (50)	Qiagen	51304

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qPCR, l'ADN standard des Leptospires pathogènes (titré en nombre de copies GE/PCR) fourni dans le kit qPCR (tube bouchon **orange**) peut être utilisé.

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (à minima : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des Master Mix prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- Les génomes des pathogènes détectés par les Bio-T Kit® sont à ADN ou à ARN. **Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN** (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), **il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN**:
 - Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
 - Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
 - Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
 - Utiliser des consommables « RNases free ».
 - Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ ou à défaut à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
 - Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

DETECTION DES LEPTOSPIRES PATHOGENES PAR qPCR AVEC LE KIT BIOTK046

Procédure globale à suivre

1) Etablir un plan de plaque définissant la position de chaque échantillon et incluant les contrôles décrits ci-dessous :

- **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction voir de prétraitement.
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait d'acides nucléiques au moment du dépôt sur la plaque qPCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.
Ce contrôle est recommandé lors de la 1ère utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du Master Mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
- **Contrôle positif d'amplification des leptospires pathogènes (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCLepto-B**, bouchon **orange**), contenant la séquence cible spécifique des Leptospires pathogènes.
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

⚠ **ATTENTION** : La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur la plaque.

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF de mucus vaginal/endocervical, d'organes de fœtus (foie, rate et rein), ou de sang total, faiblement chargé est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qPCR, la valeur de Ct de ce témoin d'extraction sera reportée et suivie dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qPCR, une valeur de Ct attendue avec ce témoin positif valide l'ensemble de la méthode. Dans ce cas, l'utilisation de l'EPC livré avec ce kit n'est plus obligatoire.

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MIMLepto-B** (tube bouchon **blanc**) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau, témoin de processus, ou EPC : tube EPCLepto-B, bouchon orange)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, au contact du Master Mix et en évitant de faire des bulles.

Note : dans le cas où l'IC exogène n'aurait pas été ajouté lors de l'extraction des échantillons, il est possible de l'ajouter au moment de la préparation de la plaque qPCR.

- **Ajouter 1 µl d'IPC-A (bouchon rose), en plus des acides nucléiques extraits**
- **Ou ajouter directement l'IPC-A (1 µl par réaction) dans un aliquote de Master Mix** avant de déposer 16 µl de ce mélange dans chaque puits d'intérêt et d'y ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits.

Le volume réactionnel sera porté à 21 µl final, sans impacter l'efficacité de la qPCR.

3. Filmer la plaque avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableau 3, Tableau 4, Tableau 5, Tableau 6)
5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles et de placer les acides nucléiques au contact du Master Mix.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 60 min pour le programme Classique sans RT.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping standard et confirmé sur AriaMx™ (Agilent Technologies, ramping Fast par défaut) et ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en ramping Fast. Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

Tableau 3. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

Tableau 4. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	DéTECTEURS		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
Leptospires pathogènes	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles [†]
IPC endogène	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IC exogène	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles [†]			

* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSella (tech@biosella.com)

[†] Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus et EPC (ADN cible des Leptospires pathogènes).

Tableau 5. Paramétrage du PROGRAMME CLASSIQUE SANS RT [†]			
Ramping Standard ou Fast			
Cycles	Temps	Température	
1 cycle	5 min	95°C	
40 cycles	15 sec	95°C	
	30 sec*	60°C	
	+ acquisition des données		

* Régler sur 31 sec pour certains thermocycleurs comme l'ABI PRISM® 7500.

[†]La réalisation d'une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR pour l'amplification des génomes à ARN n'a pas d'incidence sur l'efficacité du Bio-T kit® Leptospires pathogènes (données présentées dans le dossier de validation disponible sur demande).

L'utilisation du Bio-T kit® Leptospires pathogènes avec les programmes de la gamme PIG/AVIAN a également été validée.

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN SANS RT			
Ramping Standard ou Fast			
Cycles	Temps	Température	
1 cycle	5 min	95°C	
40 cycles	15 s	95°C	
	30 s	60°C	
	+ acquisition des données		

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qPCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations selon les paramètres définis dans l'**Annexe C de la norme NF U47-600-1**. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, *a minima* le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qPCR est validée si les contrôles (EPC, Témoin positif de processus, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles			Interprétation
	Leptospires pathogènes (FAM)	IPC endogène (VIC)	IC exogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Pos	Validé
	Au moins une des deux valences Pos			Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
	Neg	Neg	Neg	Oubli d'ajout de l'IPC exogène ? Extraction défectueuse
NC Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des trois valences Pos			Contamination avec un échantillon négatif / positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix/eau.
EPC Contrôle Positif d'amplification OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Neg	Neg	Validé
	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qPCR: erreur de Master Mix? Oubli de l'EPC?
	Pos*	Au moins une des deux valences Pos		Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
Témoin positif de processus MRI RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos†	Pos†	Pos‡	Validé
	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qPCR: Erreur de Master Mix ? Oubli d'ajout des acides nucléiques ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Dérive du processus : extraction et/ou qPCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?
	Neg	Neg	Pos‡	Dégradation de l'échantillon contrôle ? Dérive du processus : extraction (si ajout de l'IC dans la qPCR)

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA).

† La valeur de Ct doit être comprise dans les limites de la carte de contrôle.

‡ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Pour l'IC exogène, elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC endogène et d'IC exogène, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par Biosellal sont disponibles sur demande. BioSellal recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum tolérée de l'IPC et de l'IC en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

Rappels : L'IPC endogène a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants, il ne peut donc être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC cependant léger signal peut être observé pour l'IPC endogène dans les témoins négatifs en raison d'une réaction croisée entre la GAPDH des ruminants et la GAPDH humaine. Ce signal ne doit pas être inférieur à Ct 35.

Lecture des Echantillons extraits : en cas d'ajout de l'IC exogène

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons si l'IC exogène a été ajouté lors de l'extraction ou de la qPCR			
Cibles			Interprétation
Lepto (FAM)	IPC endogène (VIC)	IC exogène (Cy5)	
Neg	Pos*	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos			Positif ou Détecté
Pos	Pos*	Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté Absence de cellules en quantité suffisante ? (uniquement si IPC endogène négatif ou Ct >35) Présence d'inhibiteurs † ? Compétition avec la cible ? Problème lors de l'extraction ?
	Neg ou Ct>35	Pos*	
		Neg ou Ct>35	
Neg	Neg ou Ct>35	Pos*	Ininterprétable Risque de non détection d'un échantillon faiblement positif = analyse à refaire Présence d'inhibiteurs † ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ? (uniquement si IPC endogène négatif ou Ct >35) Problème lors de l'extraction ? Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? (uniquement si les 2 contrôles non cibles sont négatifs)
		Neg ou Ct>35	
	Pos*	Neg ou Ct>35	

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Pour l'IC exogène, elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC endogène et d'IC exogène, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par Biosellal sont disponibles sur demande. BioSellaal recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum tolérée de l'IPC et de l'IC en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

† En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qPCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

Lecture des Echantillons extraits : en absence d'IC exogène

Tableau 9. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons si l'IC exogène n'a pas été ajouté lors de l'extraction ou de la qPCR		
Cibles		Interprétation
Lepto (FAM)	IPC endogène (VIC)	
Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos		Positif ou Détecté
Pos	Neg ou Ct>35	<p>Positif ou Détecté</p> <p>Absence de cellules en quantité suffisante ? Présence d'inhibiteurs† ? Compétition avec la cible ? Problème lors de l'extraction ?</p>
Neg	Neg ou Ct>35	<p>Ininterprétable</p> <p>Risque de non détection d'un échantillon faiblement positif = analyse à refaire Présence d'inhibiteurs† ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ? Problème lors de l'extraction ? Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ?</p>

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Pour l'IC exogène, elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC endogène et d'IC exogène, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes proposées par Biosellal sont disponibles sur demande. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum tolérée de l'IPC et de l'IC en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

† En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qPCR en prédiluant les acides nucléiques extraits au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

Notes :



www.biosellal.com

Support Technique

tech@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 62

Renseignements et commandes

contact@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 60

