

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] Lumpy Skin Disease - DIVA Dermatose Nodulaire Contagieuse bovine Souches sauvages

Cat. N° BioTK055
25 réactions

**Détection des souches sauvages de LSDV
par PCR en temps réel
avec contrôle positif interne (IPC) ADN endogène**

RUMINANTS

Types d'échantillons

- Raclages de lésions cutanées ; Ecouvillons secs oraux, nasaux, conjonctivaux
- Sang total (sur tube EDTA)
- Analyses individuelles
- Conservation à 4°C ou congelé à <-20°C avant analyse

Extractions d'ADN recommandées

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)
- Billes magnétiques sur automate Maxwell[®] RSC (Promega) (Kit Viral Total Nucleic Acid Purification Cat. N° AS1330)

D'autres kits d'extraction sont utilisables : contacter notre Support Technique pour plus d'informations.

Réservé à l'usage vétérinaire



Description du Bio-T Kit® LSDV-DIVA

La technique de PCR en temps réel (qPCR) permet de révéler la présence d'acides nucléiques cibles de façon précise et rapide. Le Bio-T kit® LSDV-DIVA est une PCR triplex permettant de détecter simultanément dans la même réaction la présence spécifique du virus LSDV – souches sauvages et souche vaccinale Neethling (marquage 6-FAM), la présence de souches LSDV sauvages non vaccinales (marquage VIC) et de vérifier l'intégrité de l'échantillon, la qualité de l'extraction des acides nucléiques et de l'amplification par la présence d'un contrôle positif interne (IPC) ADN endogène de ruminants (marquage Cy5).

Ce kit est utilisable pour l'analyse individuelle de sang total, d'écouillons ou de lésions cutanées de bovins. La présence d'un EPC titré en nombre de Génome équivalent (GE) /PCR permet d'estimer la charge virale relative au sein d'un échantillon positif.

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

Etape 1 :

L'extraction et la purification des acides nucléiques sur colonnes de silice ou sur billes magnétiques est obligatoire pour les échantillons de sang total. De même elle est recommandée pour les écouillons et les lésions cutanées. BioSella propose des kits d'extraction validés :

- BioExtract® SuperBall® (BioSella, Cat. N° BES384)
- BioExtract® Column (BioSella, Cat. N° BEC050 ou BEC250)
- Viral Total Nucleic Acid Purification (Promega, Cat. N° AS1330)

Il est obligatoire d'inclure un échantillon « contrôle négatif de processus » (NCS) afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons sur l'ensemble de l'analyse. Pour réaliser ce contrôle, la prise d'essai est remplacée par de l'eau ou du PBS « RNase/DNase free », et sera traitée en parallèle des échantillons d'intérêt.

Etape 2 :

Dépôt du Master Mix dans les puits de la plaque ou des barrettes de PCR.

Etape 3 :

Ajout des extraits d'ADN.

Etape 4 :

PCR duplex en temps réel : amplification simultanée des ADN viraux et de l'ADN de l'IPC endogène.

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	MMLSDDIVA-A	410 µl	1 tube bouchon blanc Sachet A	-20°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC)* =contrôle positif mixte d'amplification LSDV et LSDV-DIVA	EPCLSDDIVA-A	110 µl	1 tube bouchon orange Sachet B	-20°C Zone « Ajout d'ADN »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	1 tube bouchon bleu Sachet B	4°C ou -20°C Zone « Ajout d'ADN »

* Voir le certificat de contrôle qualité pour le nombre de GE/PCR.

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°
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSellal	BES384

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

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (blouse, gants jetables changés fréquemment).
- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction, stockage des acides nucléiques extraits), « Mix » (stockage des MM prêt à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'ADN » (zone post-Mix, addition des ADN extraits et contrôles dans la plaque qPCR), « qPCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex, portoirs...).
- Utiliser des pointes à filtre.
- Décongeler tous les réactifs stockés à -20°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger rapidement (centri-boule) tous les réactifs avant utilisation.
- Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les DNases-RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).
- Eviter de multiplier les cycles de congélation-décongélation des échantillons, des ADN extraits.

Extraction d'ADN

BioSellal recommande 3 kits d'extraction :

- **BioExtract® Column** (Cat. N° BEC050 ou BEC250) basé sur l'utilisation de colonne de silice, préconisé pour l'extraction de 1 à 12-20 échantillons en parallèle.
- **BioExtract® SuperBall®** (Cat. N° BES384) basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation d'automates tels que le KingFisher™ Duo, mL ou Flex, préconisé pour l'extraction en parallèle de 12 échantillons ou plus.
- **Maxwell®-RSC Viral Total Nucleic Acid** (Cat. N°AS1330) basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation de l'automate Maxwell®-RSC (Promega).

Un protocole simplifié pour chaque méthode vous est proposé ci-après pour la matrice sang total.

Pour les matrices écouvillons et prélèvements cutanés, BioSellal recommande d'utiliser la procédure d'extraction et de purification validée au sein de votre laboratoire.

Pour plus d'informations, contacter notre Support Technique.

Extraction sur colonnes :

Kit BioExtract® Column

Cat. N° BEC050 ou BEC250

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

Dans un tube de 1.5 ml, ajouter :

- **20 µl de Protéinase K**
- **100 µl d'échantillon** (Sang EDTA) préalablement vortexé
- **100 µl de solution de lyse LA-carrier**. Voir Tableau 3 ci-dessous pour la solution de lyse LA-carrier :

Tableau 3. Solution de lyse LA-carrier					
Réactif	1	6*	Nombre d'échantillons		
			12*	24*	30*
Buffer LA	100 µl	660 µl	1.32 ml	2.64 ml	3.3 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	6.6 µl	13.2 µl	26.4 µl	33 µl

* Afin d'assurer le volume de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis.

Vortexer et incuber 15 min à 15–25°C (à température ambiante).

Centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) puis ajouter **350 µl de Buffer LB**.

Vortexer puis centrifuger brièvement.

2. Adsorption sur la membrane de silice

Transférer délicatement la totalité du volume (570 µl) sur la colonne BioExtract® Mini Spin Column (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur (Mettre la colonne BioExtract® dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter **600 µl de Buffer W1**.

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur.

Ajouter **600 µl de Buffer W2**.

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min**. Changer de tube collecteur.

Centrifuger à **20 000 x g pendant 2 min** pour sécher la membrane.

4. Elution des acides nucléiques

Mettre la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un nouveau tube de 1.5 ml, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter **60 µl de Buffer EL** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.

Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant **1 min**.

Centrifuger à **20 000 x g pendant 1 min**.

Transférer l'éluat (60 µl) dans un tube étiqueté ou conserver l'éluat contenu le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

L'ADN extrait peut être conservé à 4°C si la PCR est lancée dans les 8h qui suivent, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C pendant 6 mois ou à <-70°C pour une meilleure conservation.

Figure 1. Extraction avec le kit BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)

1 Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption	 20 µl de protéinase K 100 µl d'échantillon 100 µl de solution de lyse LA-carrier (Pour 1 : 100 µl Buffer LA / 1 µl carrier RNA) Température ambiante (TA) 15 min 350 µl de Buffer LB
2 Adsorption sur la membrane de silice	 Charger la colonne BioExtract® Mini Spin Column délicatement  6 000 x g 1 min
3 Lavages Séchage de la membrane de silice	 1^{er} Lavage 600 µl W1  6 000 x g 1 min 2nd Lavage 600 µl W2  6 000 x g 1 min - -  20 000 x g 2 min
4 Elution des acides nucléiques	 60 µl de Buffer EL (TA) délicatement TA 1 min  20 000 x g 1 min

Extraction avec billes magnétiques :

Kit BioExtract® SuperBall®

Cat. N° BES384

Pour utilisation avec KingFisher™ Flex, Duo ou mL

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Préparation des plaques ou barrettes

Préparer les consommables pour la série d'extraction :

Flex : 4 plaques Deep-wells et 2 microplaques. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter (voir Tableau 5).

Duo : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'éluion.

mL : 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

Déposer au fond des puits de la « Deep-well Lysat » (Flex), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL) :

- **20 µl de Protéinase K**
- **100 µl d'échantillon** (sang total sur EDTA) préalablement vortexé
- **500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier** préalablement vortexée vigoureusement (30 sec). Voir Tableau 4 ci-dessous pour la solution de lyse LAB-SMB-carrier :

Tableau 4. Solution de lyse LAB-SMB-carrier							
Réactif	Nombre d'échantillons*						
	1	5	10	12	15	48	96
Buffer LA	100 µl	550 µl	1.1 ml	1.32 ml	1.65 ml	5.28 ml	10.56 ml
Buffer LB	400 µl	2.2 ml	4.4 ml	5.28 ml	6.6 ml	21.12 ml	42.24 ml
SMB (SuperBall Magnetic Beads)‡	25 µl	137.5 µl	275 µl	330 µl	412.5 µl	1.32 ml	2.64 ml
Carrier RNA (1 µg/µl)	1 µl	5.5 µl	11 µl	13.2 µl	16.5 µl	52.8 µl	105.6 µl

* Afin d'assurer le volume de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis. Le volume de tampon en excès peut être conservé en vue d'une utilisation sous 8 jours ; au-delà de cette durée, il doit être jeté.

‡ Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes avant la première utilisation ou 1 minute pour les utilisations suivantes.

Distribuer les autres réactifs, selon le Tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5. Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, Duo et mL				
Position sur la barrette ou la plaque			Élément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex	Duo*	mL		
Deep-well Lysat	Ligne A	Position A	Lysat†	620
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Buffer W1	700
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Buffer W2	700
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Ethanol (96–100%)	750
Microplaque Elution	Elution strip	Position E	Buffer EL	60
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	A positionner manuellement	Peigne	—

* Les lignes C, D et H sont vides.

† Inclus 20 µl de Protéinase K, 100 µl d'échantillon et 500 µl de solution lyse LAB-SMB-carrier.

2. Lancement du KingFisher™

Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « BioExtract_KF_Flex », « BioExtract_KF_Duo » ou « BioExtract_KF_mL » et démarrer.

En fin de programme, récupérer les éluats.

L'ADN extrait peut être conservé à 4°C si la qPCR est lancée dans les 8 heures qui suivent, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C pendant 6 mois ou à <-70°C pour une meilleure conservation.

Figure 2. Extraction avec le kit BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)

	KingFisher™ Flex	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Elément à ajouter
1 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Lysat 	Ligne A 	Position A 	<u>Lysat</u> 20 µl de Protéinase K 100 µl d'échantillon 500 µl de solution de lyse LAB-SMB-carrier
	Deep-well Wash 1 	Ligne E 	Position B 	700 µl de Buffer W1
	Deep-well Wash 2 	Ligne F 	Position C 	700 µl de Buffer W2
	Deep-well Wash 3 	Ligne G 	Position D 	750 µl d'éthanol (96-100%)
	microplaque Elution 	Elution strip 	Position E 	60 µl de Buffer EL
	microplaque Peigne 	Ligne B  (Lignes C, D et H vides)	Le peigne est placé manuellement	Peigne (Rod Cover)
2 KingFisher™	• Allumer le KingFisher™ Flex, Duo ou mL. • Ouvrir la porte du couvercle protecteur. • Sélectionner le programme BioExtract® SuperBall® souhaité à l'aide des touches fléchées. • Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil.			

Pour avoir le programme KingFisher™ adéquat selon la version de l'automate,
veuillez contacter notre Support Technique (tech@biosellal.com).

Extraction avec billes magnétiques :

Kit Viral Total Nucleic Acid Purification

Cat. N° AS1330

Pour utilisation sur automate Maxwell (Promega)

1. Préparation de l'échantillon :

Préparer la solution de lyse-PK extemporanément pour chaque série d'extraction en suivant les indications du Tableau 6.

Tableau 6. Préparation de la solution de lyse-PK																
Réactif	Nombre d'échantillons*															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Tampon de lyse	200 µl	480 µl	720 µl	960 µl	1.2 ml	1.44 ml	1.68 ml	1.92 ml	2.16 ml	2.40 ml	2.64 ml	2.88 ml	3.12 ml	3.36 ml	3.6 ml	3.84 ml
Protéinase K (PK)	20 µl	48 µl	72 µl	96 µl	120 µl	144 µl	168 µl	192 µl	216 µl	240 µl	264 µl	288 µl	312 µl	336 µl	360 µl	384 µl

* Pour compenser les erreurs de pipetage, il est recommandé de préparer 20% de solution de lyse-PK supplémentaire, comme indiqué dans le Tableau 6 pour les exemples de 1 à 16 échantillons.

Préparer un tube eppendorf de 1.5 ml par échantillon pour la série d'extraction.

Ajouter 220 µl de solution de lyse-PK par tube eppendorf de 1.5 ml.

Ajouter 200 µl échantillon (sang total sur EDTA) préalablement vortexé, dans le tube eppendorf correspondant.

Vortexer pendant 10 secondes.

Incuber 10 minutes à température ambiante (15-25°C).

2. Chargement de la cassette :

Placer les cartouches à utiliser sur le portoir de la plateforme.

Retirer la pellicule de protection.

Placer un plongeur dans le puits n°8 de chaque cartouche. Le puits n°8 est le plus proche du tube d'élution.

Placer les tubes d'élution à l'avant du portoir de la plateforme. **Ajouter 60 µl de solution d'élution dans chacun de ces tubes** (Eau sans nucléases fournie dans le kit d'extraction).

Transférer la totalité du lysat échantillon/solution de lyse-PK (environ 420 µl) dans le puits n°1 de la cartouche (puits le plus large).

3. Maxwell® RSC :

Mettre sous tension l'appareil Maxwell (RSC) et la tablette.

Appuyer sur Start pour sélectionner le kit utilisé.

Sélectionner **Viral Total Nucleic Acid Purification**.

Sélectionner les positions des cartouches.

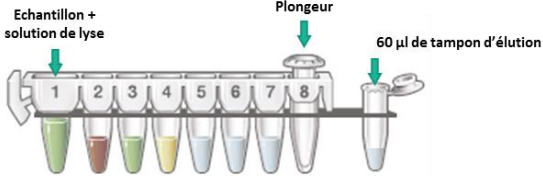
Charger le portoir de la plateforme.

Valider la liste de contrôle.

En fin de programme, récupérer les éluats (tubes d'élution).

L'ADN extrait peut être conservé à 4°C si la PCR est lancée dans les 8h qui suivent, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C pendant 6 mois ou à <-70°C pour une meilleure conservation.

Figure 3. Extraction avec le kit Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification (Cat. N° AS1330)

1 Préparation de l'échantillon	220 µl de solution de lyse-PK (200 µl de tampon de lyse + 20 µl de PK) + 200 µl d'échantillon Vortex 10 secondes Incubation à Température ambiante 10 minutes 
2 Chargement de la cassette Ne pas oublier	 • Ajouter l'échantillon + solution de lyse (420 µl au total) en position 1 • Placer le peigne en position 8 • Placer le tube d'élution et ajouter 60 µl de tampon d'élution (le laisser ouvert durant le run d'extraction).
3 Maxwell® RSC	• Allumer l'appareil Maxwell (RSC) et la tablette. • Appuyer sur Start pour sélectionner le kit utilisé. • Sélectionner Viral Total Nucleic Acid Purification. • Sélectionner les positions des cartouches. • Charger le portoir de la plateforme. • Valider la liste de contrôle.

Pour toute information supplémentaire, veuillez contacter notre Support Technique (tech@biosellal.com).

Le kit Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification (Cat. N° AS1330) peut être conservé à température ambiante (15-25°C), jusqu'à la date indiquée sur la boîte.

DETECTION DES SOUCHES SAUVAGES DE VIRUS LSDV

par qPCR

avec le Bio-T kit® LSDV-DIVA

Procédure globale à suivre

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 remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction. Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.

- **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : l'eau remplace l'extrait ADN au moment du dépôt sur la plaque de qPCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé. Ce contrôle est recommandé afin de vérifier l'absence de contamination du Master Mix lors de sa première utilisation ou suite à une contamination du NCS.

- **Contrôle positif de détection du LSDV (EPC mixte – tube bouchon **orange**)** : ADN synthétique fourni à 10⁴ copies/PCR pour chaque cible. Ce contrôle est obligatoire et permet d'estimer la charge virale d'un échantillon de façon relative.

Préparation extemporanée de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

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

Dans la zone dédiée à l'ajout de l'ADN

- 2- **Pour une quantification relative**, diluer extemporanément l'EPC titré fourni dans le kit à la concentration d'intérêt à l'aide de l'eau fournie par dilution au 1/10^{ème} (5 µl d'EPC + 45 µl d'eau) en veillant à vortexer l'EPC pur après décongélation et à homogénéiser l'EPC dilué avant utilisation.
- 3- **Ajouter 5 µl d'ADN extrait (ou NCS ou eau ou EPC pur ou EPC dilué -point Référent-)** par puits d'intérêt en veillant à les déposer bien au fond du puits, dans le Master Mix et en évitant de faire des bulles.
- 4- **Filmer la plaque ou fermer les micro-tubes** avec le film optique ou les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification

- 5- **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableaux 7 et 8).
- 6- 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.
- 7- **Démarrer le programme**. Durée de run approximative de 65 min.

Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied BioSystems) et AriaMx™ (Agilent Technologies).
Pour d’autres thermocycleurs, contacter notre Support Technique.

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

Tableau 7. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final/ puits
	Reporter	Quencher	
LSDV	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl MM + 5 µl ADN extrait ou contrôles†
LSDV-DIVA	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IPC	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@biosellal.com).

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), EPC (ADN cible LSDV) ou point Référent (EPC dilué au 1/10⁶).

Tableau 8. Paramétrage du Programme d’Amplification		
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	

* Régler sur 31 secondes pour certains thermocycleurs comme l’ABI PRISM 7500.

NB :

Le Programme d’Amplification est compatible avec l’ensemble des Bio-T kits® à l’exception des kits de la gamme PIG.
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® LSDV-DIVA.

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, NC ou NCS) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 9. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles				
	Cibles			Interprétation
	LSDV (FAM)	LSDV-DIVA (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus	Neg	Neg	Neg	Validé
OBLIGATOIRE	Neg / Pos	Neg / Pos	Pos	▪ Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l’extraction ou de la préparation de plaque.
NC Contrôle Négatif d’amplification	Neg	Neg	Neg	Validé
FACULTATIF	Neg / Pos	Neg / Pos	Pos	▪ Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de plaque ou contamination du Master Mix.
EPC Contrôle Positif de détection du LSDV	Pos Ct/Cq conforme au Certificat d’Analyse	Pos Ct/Cq conforme au Certificat d’Analyse	Neg	Validé
OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Neg	▪ Problème lors de la qPCR : Erreur de Master Mix ? Oubli de l’EPC ?
	Pos	Pos	Pos	▪ Contamination lors de la préparation de la plaque.

Lecture des Echantillons extraits

Le type de souche détectée peut être déduit d'après la positivité et la valeur de Ct comparative obtenue sur les cibles FAM et VIC.

Tableau 10. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles			Interprétation
LSDV (FAM)	LSDV-DIVA (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
Neg	Neg	Pos	Négatif ou Non détecté Non détection de virus LSDV sauvage ou de la souche Neethling vaccinale
Pos Ct x	Pos Ct x	Pos	Positif ou Détecté- Présence de souches sauvages de virus LSDV Quantification relative possible (cf. Tableau 11)
Pos Ct y	Pos Ct z>y	Pos	Positif ou Détecté- Présence de souches sauvages de virus LSDV et de souche vaccinale Neethling Quantification relative possible (cf. Tableau 11)
Pos	Neg	Pos	Positif ou Détecté – Présence de souche Vaccinale LSDV Neethling Quantification relative possible (cf. Tableau 11)
Pos	Pos	Neg ou >35	Positif ou Détecté – Présence de souche sauvage de virus LSDV Pas de quantification relative possible - Présence d'inhibiteurs ? - Compétition avec la cible ?
Pos	Neg	Neg ou >35	Positif ou Détecté – Présence de souche vaccinale Neethling Pas de quantification relative possible - Présence d'inhibiteurs ? - Compétition avec la cible ?
Neg	Neg	Neg ou > 35	Ininterprétable - Oubli d'addition d'ADN extrait ou dépôt non au contact du MM lors de la préparation de la plaque ? - Présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ? - Dégradation des ADN dans l'échantillon ?

Quantification relative des échantillons positifs

Pour une quantification relative, on utilise **un seul point « Référent »** correspondant à une charge virale donnée (en copies de génome/PCR ou GE/PCR), identifiée comme étant un seuil facilitant l'interprétation des résultats. Nous recommandons le point **1.10³ GE/PCR** correspondant à **12.10⁵ GE/ml de sang** selon notre protocole d'extraction avec un rendement d'extraction de 100%. Le point Référent (REF) est constitué à l'aide de l'EPC du kit (EPCLSDDIVA-A), à diluer au 1/10^e pour atteindre la charge d'intérêt retenue comme seuil.

La charge virale des échantillons est estimée d'après la valeur de Ct obtenue par rapport à la valeur de Ct du point REF comme illustré dans le Tableau 11.

Tableau 11. Interprétation des résultats qPCR LSDV en quantification relative		
Résultats qPCR		Interprétation
Négatif		Non détecté Quantité de GE/PCR < LDPCR
Positif	Ct ≥ Ct REF 1.10 ³ GE/PCR	Positif : +
	Ct < Ct REF 1.10 ³ GE/PCR	Fort Positif : ++

Notes :

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

