MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit® PRRSV DIVA

Cat. N° BIOTK077 - 50 réactions
Cat. N° BIOTK086 - 100 réactions

Discrimination entre la Souche vaccinale Suvaxyn® PRRS MLV (Souche vaccinale Suvaxyn®) et toutes les autres souches Européennes (PRRSV EU autres que Suvaxyn®) du Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)
par RT-PCR en temps réel (qRT-PCR)
avec contrôle positif interne (IPC) exogène

SUIDES

Types de prélèvements

- Sang total (sur tube EDTA), sérum
- Organes
- Fluides oraux
- Analyses individuelles

Extractions des acides nucléiques (AN) recommandées par BioSellal

- Billes magnétiques (ex : BioSellal – BioExtract® SuperBall® Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSellal – BioExtract® Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

Réservé à l'usage vétérinaire

GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® PRRSV DIVA dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® PRRSV DIVA, PRRSV, PCV2 & PCV3 et PCV3, détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions proposées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® PRRSV DIVA, détaillant les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR.

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

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® PRRSV DIVA 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 RT-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 impératif d'effectuer l'envoi immédiatement après le prélèvement ou à défaut de le conserver à ≤-16°C. L'envoi doit se faire sous couvert du froid positif en 24h.

Conservation après réception

Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception ou congélation à ≤ -16°C pour quelques mois et à ≤ -65°C au-delà de 1 an.

Gamme PIG

Ce kit appartient à la gamme PIG qui regroupe un ensemble de kits dédiés qui partagent des protocoles de RT-PCR communs. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal de la gamme AVIAN (informations disponibles sur www.biosellal.com).

Description du Bio-T kit® PRRSV DIVA

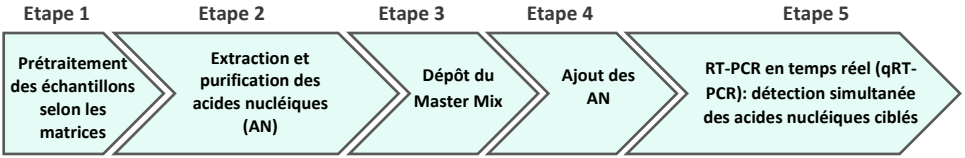
Le **Bio-T kit® PRRSV DIVA** (Cat. N° BIOTK077/BIOTK086) contient un **Master Mix RT-PCR one-step prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel,** la présence :

- **Des souches sauvages de type Européen (EU) du PRRSV et des souches vaccinales autres que la souche Suvaxyn PRRS MLV (PRRSV EU autres que Suvaxyn®)** grâce à un marquage 6-FAM,
- **De la Souche vaccinale Suvaxyn® PRRS MLV (Souche vaccinale Suvaxyn®)** grâce à un marquage VIC,
- **D'un contrôle positif exogène IPC ARN**, grâce à un marquage Cy5, à ajouter, lors de l'extraction des acides nucléiques 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 PRRSV EU autres que Suvaxyn® et de la Souche vaccinale Suvaxyn® (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de type sang ou sérum, organes et fluides oraux a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR**.

Les méthodes d'extraction proposées par BioSellal sont décrites dans le manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® PRRSV DIVA, PRRSV, PCV2 & PCV3 et PCV3.

Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qRT-PCR



Manuel d'extraction commun aux Bio-T kit® PRRSV DIVA, PRRSV, PCV2 & PCV3 et PCV3		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® PRRSV DIVA		
Sang ou sérum Fluides oraux* Organes*	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MMPRRSVDIVA-B	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC (EPCPRRSVDIVA-B) Contrôle d'artefact (CTLARTEFACT-A)	Détecteurs : FAM/VIC/Cy5 Référence passive : ROX Programme : PIG/AVIAN avec RT en ramping Standard

* prétraitement obligatoire

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit

Description	Référence	Volume / tube		Présentation	Conservation
		BIOTK077 50 réactions	BIOTK086 100 réactions		
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMPRRSVDIVA-B	1000 µl	2x1000 µl	tube bouchon transparent Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IPC) exogène Contrôle d'amplification exogène	IPCRNA-A	250 µl	2x250 µl	tube bouchon violet Sachet B	≤-16°C Zone « Extraction »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification des souches PRRSV EU autres que Suvaxyn® et de la Souche vaccinale Suvaxyn®	EPCPRRSVDIVA-B	110 µl		tube bouchon rouge Sachet C	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Contrôle d'artefact Contrôle positif d'amplification de la souche vaccinale Suvaxyn® et contrôle négatif de signal des souches sauvages de type Européen	CTLARTEFACT-A	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	BioSellal	ATL19076
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.

Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qRT-PCR, les ARN transcrits des PRRSV EU autre que Suvaxyn® et de la Souche vaccinale Suvaxyn® (titrés en nombre de copies/qRT-PCR), utilisés par BioSellal dans le dossier de validation sont requis. Un matériel de référence interne (MRI) pour les PRRSV EU autres que Suvaxyn® peut également être fourni.
BioSellal commercialise ces réactifs sous les références suivantes :

Tableau 3. Réactifs en option*			
Réactif	**Description**	**Fournisseur**	**Cat. N°**
ARN PRRSV EU autres que Suvaxyn®	ARN PRRSV EU autres que Suvaxyn® quantifié ($1{,}2 \times 10^5$ copies/qRT-PCR)	BioSellal	cARNPRRSVEU-003
ARN Souche vaccinale Suvaxyn®	ARN Souche vaccinale Suvaxyn® quantifié ($1{,}2 \times 10^5$ copies/qRT-PCR)	BioSellal	cARNPRRSVVAC001
MRI sérum	Sérum positif pour la valence PRRSV EU autre que Suvaxyn®	BioSellal	MRI-PRRSV-001

*Ces réactifs sont disponibles uniquement sur demande, contacter BioSellal (contact@biosellal.com).

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 ≤-16°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- **Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à 5°C ± 3 lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.**
- 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 kits de la **gamme PIG** 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 ≤-65°C ou à défaut à ≤-16°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…).

DISCRIMINATION ENTRE LA SOUCHE VACCINALE SUVAXYN® ET TOUTES LES AUTRES SOUCHES PPRSV EU PAR qRT-PCR AVEC LES KITS BIOTK077/BIOTK086

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 qRT-PCR. 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 de la Souche vaccinale Suvaxyn® et des souches PRRSV EU autres que Suvaxyn® (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **EPCPRRSVDIVA-B**, bouchon **rouge**), contenant les séquences cibles spécifiques de la Souche vaccinale Suvaxyn® et des PRRSV EU autres que Suvaxyn®. Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

- **Contrôle d'artefact** : il s'agit d'ADN synthétique (tube **CTLARTEFACT-A**, bouchon **orange**), contenant la séquence cible spécifique de la Souche vaccinale Suvaxyn®. Ce témoin permet d'évaluer l'allure de la courbe obtenue dans la valence PRRSV EU autres que Suvaxyn® (artéfact de la souche vaccinale Suvaxyn®, fortement positive en VIC, pouvant induire un signal faux positif en FAM) et ainsi de négativer toutes courbes plus tardives que ce contrôle pour la valence PRRSV EU autres que Suvaxyn® en cas d'échantillon fortement positif pour la valence « Souche vaccinale Suvaxyn® ». Ce contrôle est obligatoire. Il est à utiliser pur et dilué au 1/100 000 (soit 5 dilutions consécutives au 1/10).

⚠ ATTENTION : *La manipulation du tube EPC et du contrôle d'artefact 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**, dans l'idéal, un échantillon POSITIF de sang, sérum ou d'organes faiblement chargé pour les deux valences cibles, est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). A défaut, un échantillon POSITIF pour la valence PRRSV EU autre que Suvaxyn®, de sang, sérum organes ou fluides oraux, faiblement chargé peut être utilisé. Après qRT-PCR, les valeurs de Ct de ce témoin d'extraction seront reportées et suivies dans le temps sur une carte de contrôle. Le fait d'obtenir, après extraction et qRT-PCR, des valeurs de Ct attendues 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. BioSellal propose un MRI sérum prêt à l'emploi positif pour la valence PRRSV EU autre que Suvaxyn® (MRI-PRRSV-001).

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 20 µl de Master Mix MMPRRSVDIVA-B** (tube bouchon transparent) dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

   ⚠ Les Master-Mix pour RT-PCR one-step sont plus fragiles que les Master-Mix pour PCR. Afin de garantir le maintien de leurs performances, il est obligatoire de décongeler les tubes extemporanément avant leur utilisation, de bien les vortexer juste avant emploi, de les conserver à 5°C ± 3 lors du dépôt et de les recongeler aussitôt après.

Dans la zone dédiée à l'ajout des acides nucléiques

2. **Ajouter 5 µl d'acides nucléiques extraits (ou NCS, eau, témoin de processus, contrôle d'artefact** (tube **CTLARTEFACT-A** bouchon **Orange**) **ou EPC** (tube **EPCPRRSVDIVA-B,** bouchon **rouge**)) 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'IPC 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 qRT-PCR.

- **Ajouter 1 µl d'IPC (bouchon violet) en plus des acides nucléiques extraits**
- Ou ajouter directement l'IPC (1 µl par réaction) dans un aliquote de Master Mix avant de déposer 21 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 26 µl final, sans impacter les performances de la qRT-PCR.

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 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 90 min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

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

Tableau 4. Configuration du thermocycleur

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

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur

Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
PRRSV EU autres que Suvaxyn®	FAM	NFQ-MGB ou None*	**25 µl** = 20 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles†
Souche vaccinale Suvaxyn®	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IPC 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 BioSellal (tech@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus, le contrôle d'artefact et EPC.

Tableau 6. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN AVEC RT

Ramping Standard		
Cycles	**Temps**	**Température**
1 cycle	20 min	50°C
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec + acquisition des données	60°C

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des kits de la gamme PIG et AVIAN.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qRT-PCR, 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 RT-PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qRT-PCR 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. Les résultats obtenus dans la valence PRRSV EU autres que Suvaxyn® en présence d'un signal positif pour la souche vaccinale Suvaxyn® sont à comparer avec le résultat obtenu pour le **contrôle d'artéfact et de l'EPC.**

Principaux cas de figures

Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles			Interprétation
	PRRSV EU autres que Suvaxyn® (FAM)	Souche vaccinale Suvaxyn® (VIC)	IPC exogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus **OBLIGATOIRE**	Neg	Neg	Pos	Validé
	Au moins une des deux valences Pos		Pos	Contamination avec un échantillon 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.
EPC Contrôle Positif d'amplification de la Souche vaccinale Suvaxyn® et de PRRSV EU autres que Suvaxyn® **OBLIGATOIRE** *EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS*	Pos*	Pos*	Neg§	Validé
	Neg	Neg	Neg§	Problème lors de la qRT-PCR: Erreur de Master Mix? Oubli de l'EPC?
	Pos*	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
Contrôle d'artéfact contrôle négatif de signal des Souches sauvages de type Européen **OBLIGATOIRE**	Signal non spécifique/Neg	Pos*	Neg§	Validé
Témoin positif de processus MRI **RECOMMANDE** *SI DISPONIBLE*	Pos†	Pos†	Pos¥	Validé
	Neg	Neg	Neg§	Problème lors de la qRT-PCR: 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 qRT-PCR ? Dégradation de l'échantillon contrôle ?
	Neg	Neg	Pos¥	Dégradation de l'échantillon contrôle ? Dérive du processus : extraction (si ajout dans la qRT-PCR)

* 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

§ Un léger signal positif de l'IPC exogène peut être observé, ce signal ne doit pas être inférieur à Ct 35.

¥ La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC, 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 de l'IPC tolérée en fonction de sa méthode d'extraction et de son thermocycleur.

Lecture des Echantillons extraits

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
Cibles			
PRRSV EU autres que Suvaxyn® (FAM)	Souche vaccinale Suvaxyn® (VIC)	IPC exogène (Cy5)	Interprétation
Neg¥	**Pos**	**Pos***	**Positif ou Détecté** Présence de la souche vaccinale Suvaxyn®
Pos	**Neg¥**		**Positif ou Détecté** Présence de souche PRRSV EU autres que Suvaxyn®
Pos	**Pos**		**Positif ou Détecté** Présence de souche PRRSV EU autres que Suvaxyn®et de la souche vaccinale Suvaxyn®
Pos	**Pos**	**Neg ou Ct>35**	**Positif ou Détecté** Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène ? Présence d'inhibiteurs‡ ? Compétition avec la cible ?
Une des deux valences **Neg¥**		**Neg ou Ct>35**	**Positif ou Détecté pour la valence positive** **Ininterprétable = analyse à refaire pour la valence négative.** Oubli d'ajout de l'IPC exogène à l'extraction et/ou à la qRT-PCR Présence d'inhibiteurs‡ ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème lors de l'extraction ? Compétition avec la cible ?
Neg	**Neg**	**Neg ou Ct>35**	**Ininterprétable** = analyse à refaire Oubli d'addition des acides nucléiques extraits ou dépôt non au contact du Master Mix lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs‡ ? Dégradation des acides nucléiques dans l'échantillon ? Problème lors de l'ajout de l'IPC exogène ? Problème lors de l'extraction ?

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

‡ En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qRT-PCR 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.

¥ Les données obtenues par BioSellal lors de la validation du Bio-T kit® PRRSV DIVA ont démontré un phénomène de compétition entre les cibles. En effet, lorsqu'un échantillon est fortement positif pour une des deux valences, la sensibilité de détection de l'autre cible est impactée. Aussi, en cas de résultat fortement positif pour PRRSV EU autres que Suvaxyn®, il y a un risque de non détection d'une souche vaccinale Suvaxyn® en faible quantité. Le résultat négatif pour la valence souche vaccinale Suvaxyn® est donc à interpréter selon le statut vaccinal des animaux (date et protocole de vaccination, date de prélèvement de l'échantillon…). A l'inverse, en cas de résultat fortement positif pour souche vaccinale Suvaxyn®, il y a un risque de non détection d'une souche PRRSV EU autres que Suvaxyn® en faible quantité. Le résultat négatif pour la valence PRRSV EU autres que Suvaxyn® est donc à interpréter selon le contexte épidémiologique (date de vaccination, circulation virale…). Il est possible d'identifier la présence d'une souche vaccinale Suvaxyn® et d'une souche PRRSV EU autre que Suvaxyn® au sein du même échantillon grâce au séquençage NGS. Contacter BioSellal pour plus d'information. Il peut être également envisagé de réaliser un nouveau prélèvement plus tardif par rapport à la date de vaccination.

Particularités du BIOTK077 et BIOTK086

Présence d'un signal faussement positif en FAM en présence d'une souche vaccinale Suvaxyn®	Il est à noter qu'en présence de la souche vaccinale Suvaxyn®, un léger signal non spécifique pour la valence Souche vaccinale Suvaxyn® peut être observé. Afin de conforter l'analyse, un tube contrôle d'artéfact (tube bouchon **orange**) est fourni dans le Bio-T kit® PRRSV DIVA. Une gamme de dilution de ce contrôle positif est conseillée afin de vérifier l'absence d'artéfact en FAM ou d'établir l'allure de cet artéfact et ainsi négativer, en cas d'échantillon positif dans la valence PRRSV EU autres que Suvaxyn®, toutes courbes obtenues dans la valence Souche vaccinale Suvaxyn® et aparaissant plus tardivement ou au même niveau que ce contrôle.
Evaluation de l'effet de compétition entre les cibles	Lors de la validation du Bio-T kit® PRRSV DIVA, il a été identifié un phénomène de compétition entre les cibles Souche vaccinale Suvaxyn® et la souche vaccinale Suvaxyn®. L'évaluation de l'impact de cet effet inhibiteur sur la détectabilité du kit a montré : - Une détectabilité équivalente en cas de mélange équimolaire entre les deux types de souches (souches PRRSV EU autres que Suvaxyn® et souche vaccinale Suvaxyn®). - Une détectabilité similaire en cas de mélange en quantité proche entre les deux types de souches (souches PRRSV EU autres que Suvaxyn® et souche vaccinale Suvaxyn®). Plus précisément, lorsque la valeur de Ct en souches PRRSV EU autres que Suvaxyn® est de l'ordre de 27 à 29, la présence d'une forte quantité de souche vaccinale (Ct ≈ 25) a un impact limité sur la détectabilité. Lorsque la valeur de Ct en souche vaccinale Suvaxyn® est de l'ordre de 28, la présence d'une forte quantité de souche PRRSV EU autres que Suvaxyn® (Ct ≈ 25) a un impact limité sur la détectabilité. - Une perte de détectabilité lorsque que l'une des cibles est en faible quantité (Ct>29) alors que l'autre cible est en quantité élevée (Ct ≈ 25). Cette perte de détectabilité est en moyenne de 4 Ct et peut conduire à la non détection de la cible en faible quantité.

Notes :

biosellal

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