

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] BHV1 DIVA

Cat. N° BIOTK098 - 50 réactions

Détection de l'ensemble des souches de l'Herpès Virus Bovin de type 1 (BHV1gB) et discrimination des souches vaccinales BHV1 délétées gE (BHV1gE) par PCR en temps réel (qPCR) avec contrôle positif interne (IPC) endogène

BOVINS

Types de prélèvements

- Lavage broncho alvéolaire (LBA)
- Liquide d'aspiration trans-trachéale (ATT)
- Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)
- Ecouvillonnage cervical
- Organes (poumons)
- Lavage de fourreau
- Semence
- Organes de fœtus (encéphale, foie, poumon, rate)
- 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 – RNeasy[®] Mini Kit Cat N° 74104)

Réservé à l'usage vétérinaire



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® BHV1 DIVA dispose de deux manuels techniques :

- Un manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées ou proposées par BioSellal.
- Un manuel d'utilisation du Bio-T kit® BHV1 DIVA, 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® BHV1 DIVA.

En plus de ces 2 manuels, le dossier de validation ainsi que le manuel de vérification des performances du Bio-T kit® BHV1 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 <i>(sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)</i>	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 impératif d'effectuer l'envoi immédiatement après le prélèvement ou à défaut de le conserver à $\leq -16^{\circ}\text{C}$. 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 $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour quelques mois et à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ au-delà de 1 an.

Gamme RESPIRATORY

Ce Bio-T kit® appartient à la gamme RESPIRATORY qui regroupe un ensemble de kit dédié à la détection de pathogènes responsables de troubles respiratoires qui partagent des protocoles d'extraction et de PCR communs. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal à l'exception des kits des gammes PIG et AVIAN (informations disponibles sur www.biosellal.com).

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

Description du Bio-T kit® BHV1 DIVA

Le **Bio-T kit® BHV1 DIVA** (Cat. N° BIOTK098) contient un **Master Mix prêt à l'emploi**, permettant de **détecter dans le même puits réactionnel**, la présence :

- **De l'ensemble des souches (terrain et vaccinales) de l'Herpès Virus Bovin de type 1 (BHV1gB)** grâce à un marquage 6-FAM,
- **De l'ensemble des souches de l'Herpès Virus Bovin de type 1 à l'exception des souches vaccinales délétées gE (BHV1gE)** grâce à un marquage VIC,
- **D'un contrôle positif endogène IPC (gapdh)**, grâce à un marquage Cy5, 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.

Le **Bio-T kit® BHV1 DIVA** permet ainsi de discriminer les souches sauvages de BHV1 des souches vaccinales délétés sur le gène gE selon le plan d'interprétation suivant :

Tableau 1. Plan d'interprétation des cibles en fonction du statut de l'animal		
Statut de l'animal	BHV1gB (FAM)*	BHV1gE (VIC)
Sain	Non détecté	Non détecté
Infecté	Détecté	Détecté
Vacciné [†] et sain	Détecté	Non détecté
Vacciné [†] et infecté	Détecté	Détecté

*La valence FAM détecte aussi les Alphaherpesvirus suivants : L'Herpès Virus Bovin de type 5 (BoHV5), l'Herpès Virus Caprin de type 1 (CpHV1) et les Herpès Virus Cervidés de type 1 et 2 (CvHV1 et 2). Se référer au dossier de validation pour plus d'informations.

[†]Dans le cas d'une vaccination avec un vaccin vivant délété gE.

Ce kit est basé sur une détection qualitative des souches sauvages et vaccinales du BHV1 (détectées ou non détectées) à partir de prélèvements de type liquide d'aspiration trans-trachéale (ATT), lavage broncho alvéolaire (LBA), écouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP), écouvillonnage cervical[‡], organes (poumons), lavage de fourreau, semence et organes de fœtus (encéphale, foie, poumon, rate).

Il a été développé et validé suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR avec les kits d'extraction BioExtract® SuperBall® et BioExtract® Column**, sur les matrices ci-dessus sauf la matrice organes de fœtus (Pour cette matrice, il est nécessaire de suivre les protocoles décrits dans le manuel d'extraction de la gamme REPRO).

Ce kit n'a pas fait l'objet d'une validation par le Laboratoire National de Référence (LNR) de la Rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR).

[‡]La matrice écouvillonnage cervical a été validée en suivant les protocoles décrits dans le manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY. En cas de diagnostic groupé avec des pathogènes de la gamme REPRO, il est impératif de suivre les protocoles décrits dans le manuel d'extraction de la gamme REPRO. Dans ces conditions la détection de BHV1 n'a pas fait l'objet d'une validation de la méthode complète par BioSella.

Les méthodes d'extraction validées et proposées sont décrites dans le manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY.

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



Manuel d'extraction de la gamme RESPIRATORY		Manuel d'utilisation du Bio-T kit® BHV1 DIVA		
Liquide d'aspiration trans-trachéale (ATT)				
Ecouvillonnage naso-pharyngé profond (ENP)				
Ecouvillonnage cervical	BioExtract® SuperBall®		Echantillons NC/NCS	Détecteurs : FAM/VIC/Cy5
Lavage broncho alvéolaire (LBA)	BioExtract® Column	Master Mix prêt à l'emploi MMBHV1DIVA-A	Témoin positif de processus EPC (EPCBHV1DIVA-A)	Référence passive : ROX
Organes (poumons)	RNeasy® Mini Kit			Programmes : Classique ± RT en ramping Standard ou Fast
Lavage de fourreau				
Semence				
Organes de fœtus (encéphale, foie, poumon, rate)				

Pour la matrice organes de fœtus (encéphale, foie, poumon, rate) ou en cas de diagnostique groupé avec un pathogène de la gamme REPRO et notamment en raison des risques zoonotiques liés à *Coxiella burnetii*, se référer au manuel d'extraction de la gamme REPRO.

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 2. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMBHV1DIVA-A	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
External Positive Control (EPC) Contrôle positif d'amplification de BHV1 (BHV1gB et BHV1gE)	EPCBHV1DIVA-A	110µl	tube bouchon orange Sachet B	≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	tube bouchon bleu Sachet B	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 3. 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
RNeasy® Mini Kit	Kit d'extraction ARN format colonne (50)	Qiagen	74104

Liste des réactifs de vérification des performances

Pour les adoptions de qPCR et de méthode, les ADN standards de BHV1gB et BHV1gE (titrés en nombre de copies/qPCR) et une suspension virale non inactivée de BHV1 (titrée en DICT50/ml) utilisés par BioSellal dans le dossier de validation sont requis. La suspension virale pourra être utilisée afin de réaliser un matériel de référence interne (MRI).

BioSellal commercialise ces réactifs sous les références suivantes :

Tableau 4. Réactifs en option*			
Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
ADN BHV1gB	ADN BHV1gB quantifié (6 x 10 ³ copies/qPCR)	BioSellal	cADN-BHV1gB-001
ADN BHV1gE	ADN BHV1gE quantifié (6 x 10 ³ copies/qPCR)	BioSellal	cADN-BHV1gE-001
Suspension virale BHV1 non inactivée	Suspension virale BHV1 titrée (4 x 10 ³ DICT50/ml)	BioSellal	SV-BHV1-001

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

Principales précautions à appliquer

- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (*a 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 kits de la **gamme RESPIRATORY** 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:**
 - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
 - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
 - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
 - o Utiliser des consommables « RNases free ».
 - o 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 $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
 - o 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 DES SOUCHES VACCINALES DELETEDES gE (BHV1gE) DES AUTRES SOUCHES (BHV1gB) PAR qPCR AVEC LE KIT BIOTK098

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 de BHV1 (BHV1gB et BHV1gE) (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétique (tube EPCBHV1DIVA-A, bouchon **orange**), contenant les séquences cibles spécifiques du BHV1gB et du BHV1gE.
Ce contrôle est obligatoire sauf en cas d'utilisation d'un témoin positif de processus.

⚠ ATTENTION : La manipulation du tube EPC ou des tubes de standard 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 la matrice d'intérêt, faiblement chargé, est extrait en même temps que les échantillons en un ou plusieurs exemplaires (selon le nombre d'échantillons analysés). Après qPCR, 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 qPCR, des valeurs de Ct attendues pour les deux valences 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.
- BioSella propose une suspension virale permettant de constituer le MRI (Cat. N° SV-BHV1-001)

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au « MIX »

1. Après décongélation, vortex et brève centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMBHV1DIVA-A** (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, MRI , ou EPC: tube EPCBHV1DIVA-A, 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.
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 5, Tableau 6, Tableau 7, Tableau 8)
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.

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 et en ramping fast. Il est compatible avec tous les thermocycleurs possédant à minima les canaux de lectures 6-FAM, VIC et Cy5. Pour plus d'information, contacter notre support technique.

Tableau 5. Configuration du thermocycleur		
	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard ou Fast	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

Tableau 6. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	DéTECTEURS		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
BHV1gB	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl Master Mix + 5 µl d'acides nucléiques ou contrôles [†]
BHV1gE	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IPC endogène	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 BioSellaal (tech@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite), le témoin de processus et EPC (ADN cible de BHV1gB et BHV1gE).

Tableau 7. 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® BHV1 DIVA (données présentées dans le dossier de validation disponible sur demande).

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des Bio-T kit® à l'exception des gammes PIG et AVIAN.

Pour les thermocycleurs LightCycler®480 et LightCycler®96 (Roche Life Science), BioSellaal recommande d'utiliser le programme suivant :

Tableau 8. Paramétrage du PROGRAMME PIG/AVIAN SANS RT [†]		
Ramping Standard		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	10 sec	95°C
	45 sec	60°C
	+ acquisition des données	

† Une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR peut être réalisée dans le cadre d'une analyse simultanée avec des pathogènes dont le génome est à ARN

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 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, MRI, NCS ou NC) 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
	BHV1gB (FAM)	BHV1gE (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
NCS Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Neg	Validé
	Au moins une des trois valences Pos			Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
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 de BHV1gB et de BHV1gE OBLIGATOIRE <i>EN ABSENCE DU TEMOIN POSITIF DE PROCESSUS</i>	Pos*	Pos*	Neg	Validé
	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 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 ?

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

† Les valeurs de Ct doivent être comprises 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. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T kit® BHV1 DIVA. BioSella recommande au laboratoire de déterminer sa propre valeur maximum de l'IPC tolérée 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 bovins, il ne peut donc être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC. Cependant, un léger signal peut être observé pour l'IPC dans les témoins 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

Tableau 10. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons			
Cibles			Interprétation
BHV1gB (FAM)	BHV1gE (VIC)	IPC endogène (Cy5)	
Neg	Neg		Negatif ou Non détecté
Pos	Neg	Pos*	Positif ou Détecté Présence de souche vaccinale délétée sur le gène gE (animaux vaccinés et sain ou avec un titre viral plus faible que le seuil de détectabilité de la méthode)
Pos	Pos		Positif ou Détecté Présence de souche terrain BHV1 et/ou d'un vaccin non délété sur le gène gE. Il est également possible que l'échantillon soit un mélange d'une souche terrain et d'un vaccin délété gE (animaux infecté et vacciné avec vaccin délété gE)
Pos	Pos	Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté pour la valence détectée Ininterprétable pour la valence négative = analyse à refaire Compétition avec la cible ? Problème lors de l'extraction ? Présence d'inhibiteurs ? Problème de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ?
Pos	Neg		
Neg	Pos		
Neg	Neg	Neg ou Ct>35	Ininterprétable = analyse à refaire Oubli d'ajout 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 de prélèvement : quantité de cellules insuffisante ? Problème lors de l'extraction ?

* La valeur de Ct obtenue dépend du thermocycleur, de la matrice analysée et des méthodes d'extractions utilisées. Des valeurs d'IPC, obtenues à partir des différentes matrices avec les méthodes validées par BioSella, sont présentées dans le dossier de validation du Bio-T Kit® BHV1 DIVA. BioSella 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 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

