

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] BoNT all types

Cat. N° BIOTK061 - Pack (BIOTK062, BIOTK063, BIOTK064, BIOTK065)

Contenant un kit de chacune des références :

Bio-T kit[®] BoNT A & F

Cat. N° BIOTK062 – 50 réactions

Bio-T kit[®] BoNT B & E

Cat. N° BIOTK063 – 50 réactions

Bio-T kit[®] BoNT C & D

Cat. N° BIOTK064 – 50 réactions

Bio-T kit[®] BoNT G

Cat. N° BIOTK065 – 50 réactions

Détection des Neurotoxines Botuliques (Botulinum Neurotoxins, BoNT) de type A & F, B & E, C & D, G par PCR en temps réel (qPCR) avec contrôle positif interne (IPC) exogène

Types de prélèvements

- Aliments pour l'Homme et les animaux
- Echantillons environnementaux (boues, lisiers...)
- Toutes autres matrices susceptibles de contenir les gènes des neurotoxines botuliques
- Analyses individuelles

Non utilisable pour le diagnostic

GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® BoNT all types dispose d'un manuel d'utilisation détaillant les différentes étapes de préparation des qPCR. La dernière version en vigueur de ce document figure dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec les différents Bio-T kit® composant le pack.

GESTION DES REVISIONS

BioSella 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

Selon les recommandations du CNR des bactéries anaérobies et botulisme (Institut Pasteur, Paris), les aliments ou les échantillons environnementaux peuvent être envoyés à température ambiante, de préférence dans un récipient hermétique sans condition de délais.

Conservation après réception

La conservation des échantillons est recommandée à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$ pendant 7 jours maximum puis $\leq -16^{\circ}\text{C}$ au-delà.

Gamme FOOD

Le Bio-T kit® BoNT all types est un pack de 4 kits, appartenant à la gamme FOOD. Celle-ci regroupe un ensemble de kits dédiés à la détection de pathogènes ou de gènes codant pour des protéines responsables de troubles sanitaires chez l'Homme ou les Animaux et qui partagent des protocoles de PCR communs. Il est également compatible avec les autres kits BioSellal à l'exception des gammes PIG et AVIAN (informations disponibles sur www.biosellal.com).

Description du Bio-T kit® BoNT all types

Le Bio-T kit® BoNT all types (Cat. N° BIOTK061) est composé de 4 kits :

- Bio-T kit® BoNT A & F Cat. N° BIOTK062 - 50 réactions
- Bio-T kit® BoNT B & E Cat. N° BIOTK063 - 50 réactions
- Bio-T kit® BoNT C & D Cat. N° BIOTK064 - 50 réactions
- Bio-T kit® BoNT G Cat. N° BIOTK065 - 50 réactions

Description du Bio-T kit® BoNT A & F

Le Bio-T kit® BoNT A & F (Cat. N° BIOTK062) permet de détecter dans le même puits réactionnel, la présence :

- des gènes codant pour BoNT A grâce à un marquage 6-FAM,
- des gènes codant pour BoNT F grâce à un marquage VIC,
- d'un contrôle positif exogène IPC ADN, 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.

Description du Bio-T kit® BoNT B & E

Le Bio-T kit® BoNT B & E (Cat. N°BIOTK063) permet de détecter dans le même puits réactionnel, la présence :

- des gènes codant pour BoNT B grâce à un marquage 6-FAM,
- des gènes codant pour BoNT E grâce à un marquage VIC,
- d'un contrôle positif exogène IPC ADN, 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.

Description du Bio-T kit® BoNT C & D

Le Bio-T kit® BoNT C & D (Cat. N°BIOTK064) permet de détecter dans le même puits réactionnel, la présence :

- des gènes codant pour BoNT C grâce à un marquage 6-FAM,
- des gènes codant pour BoNT D grâce à un marquage VIC,
- d'un contrôle positif exogène IPC ADN, 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.

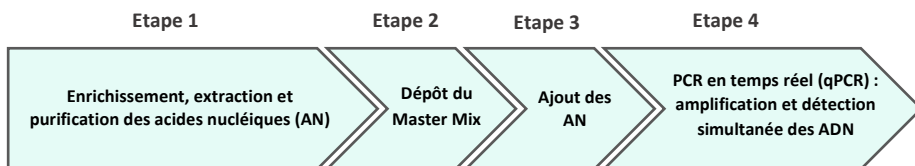
Description du Bio-T kit® G

Le Bio-T kit® BoNT G (Cat. N°BIOTK065) permet de détecter dans le même puits réactionnel, la présence :

- des gènes codant pour BoNT G grâce à un marquage 6-FAM,
- d'un contrôle positif exogène IPC ADN, 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.

Ces 4 kits sont basés sur une détection qualitative de BoNT A et F, B et E, C et D, G (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de types alimentaires, de boues ou toutes autres matrices susceptibles de contenir les gènes des neurotoxines botuliques. Ils ont été développés et validés suivant les prescriptions de la norme **NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR**.

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



Méthode d'enrichissement et d'extraction selon la norme ISO/TS 17919 :2013	Manuel d'utilisation du Bio-T kit® BoNT		
	MasterMix prêt à l'emploi	Echantillons NC/NCS Témoin positif de processus EPC	Détecteurs : FAM/VIC/Cy5 pour A&F, B&E, C&D FAM/Cy5 pour G Référence passive : ROX Programme : Classique sans RT
Matrice alimentaires Boues Toutes autres matrices susceptibles de contenir les gènes des neurotoxines botuliques L'IPC (bouchon rose) est à ajouter lors de l'extraction à raison de 5µl par échantillon. L'IPC est commun aux 4 kits BoNT, BioSella recommande de l'ajouter dans le tampon de lyse.	MMBonTAF-A MMBonTBE-A MMBonTCD-A MMBonTG-A		

Contenu des kits et conditions de conservation

Bio-T kit® BoNT A & F

Cat. N° BIOTK062 - 50 réactions

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit BoNT A & F

Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) prêt à l'emploi	MMBoNTAF-A	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IPC) 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 de BoNT A et F	EPCBoNTAF-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 B	5°C ±3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Bio-T kit® BoNT B & E

Cat. N° BIOTK063 - 50 réactions

Tableau 2. Descriptif du contenu du kit BoNT B & E

Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) prêt à l'emploi	MMBoNTBE-A	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IPC) 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 de BoNT B et E	EPCBoNTBE-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 B	5°C ±3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Bio-T kit® BoNT C & D

Cat. N° BIOTK064 - 50 réactions

Tableau 3. Descriptif du contenu du kit BoNT A & F

Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) prêt à l'emploi	MMBoNTCD-A	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IPC) 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 de BoNT C et D	EPCBoNTCD-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 B	5°C ±3 ou ≤-16°C Zone « Ajout d'acides nucléiques »

Bio-T kit® BoNT G

Cat. N° BIOTK065 - 50 réactions

Tableau 4. Descriptif du contenu du kit BoNT A & F

Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) prêt à l'emploi	MMBoNTG-A	750 µl	tube bouchon blanc Sachet A	≤-16°C à l'abri de la lumière, Zone « MIX »
Internal Control (IPC) 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 de BoNT G	EPCBoNTG-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 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.

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 MM 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.
- 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.

DETECTION DES BoNT A & F, B & E, C & D et G PAR qPCR AVEC LE KIT BIOTK061 (BIOTK062, BIOTK063, BIOTK064 ET BIOTK065)

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 pré-traitement.
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'extraire d'acides nucléiques au moment du dépôt sur 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 BoNT (EPC)** : il s'agit d'ADN synthétiques fournis (tubes **EPCBoNTAF-A**, **EPCBoNTBE-A**, **EPCBoNTCD-A**, **EPCBoNTG-A**: bouchons **orange**), contenant respectivement les séquences cibles spécifiques de BoNT A et BoNT F; BoNT B et BoNT E ; BoNT C et BoNT D ; BoNT G.
Ces contrôles sont obligatoires 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 plaque.

- Si disponible, **Témoin positif de processus « sentinelle », MRI**, un échantillon POSITIF de la matrice 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 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** MMBonTAF-A, MMBonTBE-A, MMBonTCD-A **ou** MMBonTNG-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, témoin de processus ou EPC bouchon orange)** 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.

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 qPCR.

- **Ajouter 1 µl d'IPC (bouchon rose) en plus des AN extraits**

- Ou ajouter directement l'IPC (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'AN.

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 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.
6. Démarrer le programme. Durée de run approximative de 70 min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast en ramping Standard et confirmé sur AriaMx™ (ramping Fast par défaut). Pour d'autres thermocycleurs, 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	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

Pour les Bio-T kit® BoNT A & F, Bio-T kit® BoNT B & E, Bio-T kit® BoNT C & D

Tableau 6. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
BoNT A ou BoNT B ou BoNT C	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl MM + 5 µl d'acides nucléiques extraits ou contrôles†
BoNT F ou BoNT E ou BoNT D	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IPC exogène	Cy5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

Pour le Bio-T kit® BoNT G

Tableau 7. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final / puits
	Reporter	Quencher	
BoNT G	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl MM + 5 µl d'acides nucléiques extraits ou contrôles†
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 BioSellaal (tech@biosellaal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite) et EPC

Tableau 8. Paramétrage du PROGRAMME CLASSIQUE 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	

* 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® BoNT all types (données présentées dans le dossier de validation disponible sur demande).

NB : Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des Bio-T kits® à l'exception des gammes 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, Contrôle 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 pour les Bio-T kit® BoNT A & F, Bio-T kit® BoNT B & E, Bio-T kit® BoNT C & D

Tableau 9. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

	Cibles			Interprétation
	BoNT A ou BoNT B ou BoNT C (FAM)	BoNT F ou BoNT E ou BoNT D (VIC)	IPC exogène (Cy5)	
NCS	Neg	Neg	Pos	Validé
Contrôle Négatif de processus	Au moins une des deux valences Pos		Pos	Contamination avec un échantillon positif lors de l'extraction ou de la préparation de la plaque.
OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Neg	Oubli d'ajout de l'IPC exogène ? Extraction défectueuse
NC	Neg	Neg	Neg	Validé
Contrôle Négatif d'amplification	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.
FACULTATIF				
EPC	Pos*	Pos*	Neg	Validé
Contrôle Positif d'amplification de BoNT A et F ou BoNT B et E ou BoNT C et D	Neg	Neg	Neg	Problème lors de la qPCR: Erreur de Master Mix ? Oubli de l'EPC ?
OBLIGATOIRE	Pos*	Pos*	Pos	Contamination lors de la préparation de la plaque par un échantillon.
<i>EN ABSENCE DU CONTROLE POSITIF DE PROCESSUS</i>				
Contrôle positif de processus MRI	Pos†	Pos†	Pos‡	Validé
RECOMMANDE <i>SI DISPONIBLE</i>	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 dans la qPCR)
	Neg	Neg	Pos‡	

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA) du Bio-T kit® considéré.

† 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. Elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC sont disponibles sur demande. 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.

Lecture des Contrôles pour le Bio-T kit® BoNT G

Tableau 10. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles

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

* La valeur de Ct obtenue doit être conforme à la valeur donnée sur le certificat d'analyse (CA) du Bio-T kit® considéré.

† 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. Elle doit être, au maximum, comprise dans l'intervalle spécifié sur le certificat d'analyse (CA). Des valeurs d'IPC sont disponibles sur demande. 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.

Lecture des Echantillons extraits pour les Bio-T kit® BoNT A & F, Bio-T kit® BoNT B & E, Bio-T kit® BoNT C & D

Tableau 11. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles		IPC exogène (Cy5)	Interprétation
BoNT A ou BoNT B ou BoNT C (FAM)	BoNT F ou BoNT E ou BoNT D (VIC)		
Neg	Neg [‡]	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos [‡]	Pos		Positif ou Détecté
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 qPCR 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 sont disponibles sur demande. 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 pré-diluant l'AN extrait au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

‡ En cas d'échantillon doublement positif pour les valences BoNT A&F et dans le cas où la valence BoNT A est fortement positive, l'allure des courbes pour BoNT F peut être impacté en raison d'un phénomène de compétition. Aussi, BioSella recommande d'apporter une vigilance particulière aux courbes BoNT F en cas de fort positif BoNT A.

Lecture des Echantillons extraits pour le Bio-T kit® BoNT G

Tableau 12. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles		Interprétation
BoNT G (FAM)	IPC exogène (Cy5)	
Neg	Pos*	Négatif ou Non détecté
Pos		Positif ou Détecté
Pos	Neg ou Ct>35	Positif ou Détecté Problème lors de l'ajout de l'IPC Présence d'inhibiteurs† ? Compétition avec la cible ?
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 ?

* 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 sont disponibles sur demande. 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 pré-diluant l'AN extrait au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.



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

