



## MANUAL DE USO

# Bio-T kit® PRRSV DIVA

Cat. N° BIOTK077– 50 reacciones

Cat. N° BIOTK086– 100 reacciones

**Discriminación entre la Cepa Vacunal Suvaxyn® PRRS MLV (“Cepa Vacunal Suvaxyn®”) y el resto de Cepas Europeas (“PRRSV EU Otras que Suvaxyn®”) del Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV) por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) con Control Interno Positivo (IPC) exógeno.**

### PORCINO

#### Tipo de muestras :

- Sangre total (tubo EDTA), suero
- Órganos
- Fuidos orales
- Análisis individuales

#### Extracción de los ácidos nucleicos (AN) recomendadas :

- Bolas magnéticas (ex : BioSella – BioExtract® SuperBall® Cat. N° BES384)
- Columnas de sílice (ex : BioSella – BioExtract® Column Cat. N° BEC050 ou BEC250)

*Reservado para uso veterinario*



# GESTIÓN DE LOS DOCUMENTOS

El Bio-T kit® PRRS DIVA tiene dos manuales técnicos:

- Un manual de extracción de los Ácidos Nucleicos Virales. Este manual es común para los kits Bio-T kit®, PRRSV, PCV2&PCV3 y PCV3, y en él se detallan métodos propuestos por BioSella para la extracción optimizada de los Ácidos Nucleicos Virales.
- Un manual de uso del Bio-T kit® PRRS DIVA, donde se detallan las diferentes etapas de preparación de la qRT-PCR.

Las últimas versiones en vigor de estos documentos quedan perfectamente detalladas en el Certificado de Análisis (CA) que se proporciona con el Bio-T kit® PRRS DIVA.

Además de estos dos documentos, el dossier de validación y el dossier de verificación del rendimiento del T kit® PRRSV DIVA están disponibles bajo demanda, contactar con BioSella (contact@biosella.com).

## GESTIÓN DE LAS REVISIONES

BioSella indica las modificaciones hechas a este documento resaltándolas de acuerdo con las reglas presentadas en la tabla a continuación:

Gestión de las revisiones			
Tipo de modificación Color del subrayado	Modificaciones menores	Modificaciones mayores 1	Modificaciones mayores 2
Impacto en la revisión /versión	Cambio en la fecha de revisión del documento No se cambia la versión del documento	Cambio en la fecha de revisión del documento + cambio en la versión del documento	Cambio en la fecha de revisión del documento + cambio en la versión del documento
Impacto en la adopción del método permitido	Ninguno (excepto en el caso de añadir una matriz)	Ninguno	Se necesita una nueva adopción
Ejemplos de modificaciones	Correcciones : tipográficas, gramaticales o de formato	Cambio en la referencia de un EPC	Modificación en la receta de una Master Mix
	Añadir nuevas matrices en la extracción	Cambio en la referencia de un IPC exógeno	Modificación en un protocolo de extracción validado.
	Agregar nuevas informaciones con más detalles/alternativas a un determinado protocolo.		
	Añadir/Eliminar información adicional.		

# PRESENTACIÓN

## Recomendaciones para la toma, envío y conservación de las muestras

La técnica de RT-PCR en tiempo real revela la presencia de cantidades muy pequeñas de genoma del patógeno. Este patógeno puede degradarse más o menos rápidamente dependiendo de su naturaleza (bacterias / parásitos, virus envueltos o no ...), la naturaleza de su genoma (ADN / ARN) y el tipo de muestra (presencia de ADNasas / ARNasas... ). Por lo tanto, BioSellal recomienda seguir las siguientes recomendaciones para garantizar un diagnóstico óptimo.

### Toma de muestras

Con el fin de evitar la contaminación cruzada entre las muestras (puede conducir a un resultado falso positivo), es importante utilizar equipos de muestreo de un solo uso y evitar el contacto directo entre muestras.

### Envío de muestras

Es imperativo realizar el envío inmediatamente después de muestrear. Si esto no es posible, mantener las muestras a temperatura  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del envío. El envío debe de hacerse refrigerado.

### Conservación de las muestras

Las muestras deberán de procesarse para su análisis inmediatamente después de la recepción. Si esto no es posible, se deberán mantener a  $\leq -16^{\circ}\text{C}$  durante unos meses y a  $\leq -65^{\circ}\text{C}$  después de 1 año.

## Gamma PIG

Este kit pertenece a la gama PIG, que incluye un conjunto de kits que comparten protocolos RT-PCR. También es compatible con otros kits de la gama AVIAN de BioSellal (información disponible en [www.biosellal.com](http://www.biosellal.com)).

# Descripción del kit Bio-T kit® PRRSV DIVA

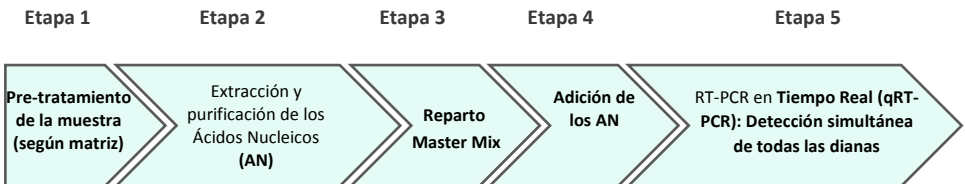
El **Bio-T kit® PRRSV DIVA** (Cat. BIOTK077 / BIOTK086) contiene una **Master Mix de RT-PCR lista para usar**, que permite detectar la presencia de:

- **Cepas Salvajes europeas (EU) de PRRSV y cepas vacunales distintas a Suvaxyn PRRS MLV cepa (“PRRSV EU otras que Suvaxyn®”)** por marcaje con 6-FAM,
- **Cepa PRRSV 96V198 modificada; Cepa Vacunal Suvaxyn® PRRS MLV (“Cepa Vacunal Suvaxyn®”)** con un marcaje VIC,
- **Un control positivo exógeno, ARN de IPC**, gracias al marcado con Cy5. Este IPC se agregará durante la extracción de ácidos nucleicos para validar la calidad de la extracción y la ausencia de inhibición de la reacción de amplificación de los Ácidos Nucleicos extraídos.

Este kit, basado en una detección cualitativa de PRRSV EU otras que Suvaxyn® y Cepa Vacunal Suvaxyn® (detectada o no detectada) a partir de muestras individuales de sangre /suero, órganos y fluidos orales, ha sido desarrollado y validado de acuerdo con las prescripciones del estándar NF U47-600-2 publicado por AFNOR.

Los métodos de extracción propuestos por BioSellal se describen en el manual de extracción común al kit Bio-T® PRRSV DIVA, PRRSV, PCV2&PCV3 y PCV3.

## Descripción de los pasos a seguir desde la recepción de la muestra hasta el resultado



Manual de extracción común para Bio-T kit®, PRRSV, PCV2&PCV3 y PCV3		Manual de uso para Bio-T kit®		
Sangre o suero Fluidos orales* Órganos*	BioExtract® SuperBall® BioExtract® Column	Master Mix lista para su uso MMPRRSVDIVA-B	Muestras NC/NCS Muestra Positiva EPC (EPCPRRSVDIVA-B) Control Artefacto (CTLARTEFACT-A)	Detectores : FAM/VIC/Cy5 Referencia pasiva : ROX Programa : PIG/AVIAN RT con rampa estándar

\* pre-tratamiento obligatorio

## Contenido del kit y condiciones de conservación

Tabla 1. Descripción del contenido del kit

Descripción	Referencia	Volumen / Tubo		Presentación	Conservación
		50 reacciones	100 reacciones		
<b>Master Mix (MM)</b> Lista para uso	MMPRRSVDIVA-B	1000 µl	2x1000 µl	Tubo tapón transparente Bolsa A	≤-16°C fuera de la luz, Zona « MIX »
<b>Control Positivo Interno (IPC) exógeno</b> Control Amplificación Exógeno	IPCRNA-A	250 µl	2x250 µl	Tubo tapón <b>violeta</b> Bolsa B	≤-16°C Zona « Adición AN»
<b>Control Positivo Externo (EPC)</b> Control Positivo de amplificación para cepas PRRSV EU otras que Suvaxyn® y de la cepa vacunal Suvaxyn®	EPCRRSVDIVA-B		110 µl	Tubo tapón <b>rojo</b> Bolsa C	≤-16°C Zona « Adición AN»
<b>Control Artefacto</b> Control Positivo de Amplificación de la cepa vacunal Suvaxyn® y Control Negativo de Amplificación de las cepas PRRSV EU Otras que Suvaxyn®	CTLARTEFACT-A		110 µl	Tubo tapón <b>naranja</b> Bolsa C	≤-16°C Zona « Adición AN»
<b>Agua</b> RNasa/DNasa libre	Aqua-A		1 ml	Tubo tapón <b>azul</b> Bolsa C	5°C ± 3 ou ≤-16°C Zona « Adición AN»

Los reactivos que se suministran con el kit son estables hasta la fecha de caducidad que figura en la bolsa (A, B o C), siempre que los reactivos se conserven en las condiciones arriba indicadas.

## Lista de consumibles y reactivos no suministrados por el kit

Tabla 2. Consumibles y reactivos no suministrados por el kit			
Consumible /Reactivo	Descripción	Proveedor	Cat. N°
Tampón ATL	Tampón para lisis	BioSellal	ATL19076
BioExtract® Column	Kit de extracción ADN/ARN Formato columna (50)	BioSellal	BEC050
BioExtract® Column	Kit de extracción ADN/ARN Formato columna (250)	BioSellal	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit de extracción ADN/ARN Formato Bolas magnéticas (4 x 96)	BioSellal	BES384

Para los consumibles usados con el termociclador, por favor dirigirse al Manual de Usuario del correspondiente instrumento.

## Lista de los reactivos para verificar el rendimiento

Los ARN transcritos de "PRRSV EU Otras que Suvaxyn®" y de la "Cepa Vacunal Suvaxyn®" (títulos en nombre de copias/qRT-PCR), utilizados por BioSellal en la validación del kit están disponibles. Un Material de Referencia Interna (MRI) está también disponible.

BioSellal comercializa estos reactivos con las siguientes referencias:

Tabla 1. Reactivos opcionales*			
Reactivos	Descripción	Proveedor	Cat. N°
ARN PRRSV EU otras que Suvaxyn®	ARN cuantificado (1,2 x 10 <sup>5</sup> copias/qRT-PCR)	BioSellal	cARNPRRSVEU-003
ARN Cepa vacunal Suvaxyn®	ARN cuantificado (1,2 x 10 <sup>5</sup> copias/qRT-PCR)	BioSellal	cARNPRRSVAC001
MRI suero	Suero positivo para la diana PRRSV EU otras que Suvaxyn®	BioSellal	MRI-PRRSV-001

\*Estos reactivos están disponibles sólo bajo demanda, contactar con BioSellal (contact@biosellal.com).

## Principales precauciones

- Use el equipo de protección personal adecuado (al menos: bata, guantes desechables, incluso gafas de seguridad, máscara FFP3 de acuerdo con los riesgos zoonóticos ...).
- Trabaje en zonas dedicadas y separadas para evitar cualquier contaminación: "Extracción" (almacenamiento de muestras no extraídas, equipos y material de extracción,...), "Mix" (almacenamiento de las Master Mix, preparación de placas qPCR), "Adición de AN" (almacenamiento y adición de ácidos nucleicos extraídos y controles en la placa de qPCR), "PCR" (zonas que contienen el (los) termociclador (es)).
- Use equipo dedicado para cada área de trabajo (guantes, bata, pipetas, vórtex ...).
- Descongele todos los reactivos almacenados a  $\leq -16$  ° C antes de usar.
- Agite en vórtex y centrifuge brevemente (centrífuga de mesa) todos los reactivos justo antes de usarlos.
- Las Master Mix para RT-PCR de un solo paso son mucho más frágiles que las Master Mix para PCR. Para garantizar el mantenimiento del rendimiento de este tipo de Master Mix, es obligatorio descongelar los tubos antes de usarlos, agitarlos justo antes de usarlos, mantenerlos a  $5$  ° C  $\pm 3$  al momento de dispensarlos y volver a congelarlos inmediatamente después.
- Utilice siempre puntas con filtro.
- Se recomienda no exceder los 3 ciclos de congelación y descongelación en los reactivos, muestras, lisados y ácidos nucleicos extraídos. Dependiendo de su uso, le recomendamos que haga alícuotas de volumen adecuado.
  
- Los genomas de los patógenos detectados por los kits del rango PIG pueden ser tanto ADN como ARN. Trabajar con ARN es más exigente que trabajar con ADN (inestabilidad del ARN y RNasas ubicuas), se recomienda por tanto, aplicar siempre, por defecto, las precauciones relacionadas con el uso de ARN:
  - o Siempre use guantes y cámbielos con frecuencia, especialmente después del contacto con la piel, el banco de trabajo o el equipo.
  - o Trate todas las superficies y equipos con agentes de inactivación de las RNasas (disponibles en el mercado).
  - o Después de ponerse los guantes y descontaminar el material, minimice el contacto con las superficies y el equipo para evitar la reintroducción de RNasas.
  - o Utilizar consumibles "RNasas libres".
  - o Se recomienda almacenar los ARN refrigerados durante la manipulación y congelarlos lo antes posible, preferiblemente a  $\leq -65$  ° C ó a  $\leq -16$  ° C.
  - o Abra y cierre los tubos individualmente y limite los tiempos de apertura para evitar el contacto con las RNasas presentes en el ambiente (piel, polvo, superficies de trabajo ...).

# DISCRIMINACIÓN ENTRE LA CEPA VACUNAL SUVAXYN® y PRRSV EU OTRAS QUE SUVAXYN® MEDIANTE qRT-PCR CON LOS KITS BIOTK077/BIOTK086

## Procedimiento global a seguir

**1) Establecer un plana de placa** definiendo perfectamente la posición en la placa de cada una de las muestras e **incluyendo todos y cada uno de los controles** que se describen a continuación :

- **Control Negativo de Proceso (NCS)** : Agua (o PBS) que será tratada como una muestra más, desde la etapa de extracción. Este control es obligatorio en cada una de las series de extracción.

- **Control Negativo de Amplificación (NC)** : 5 µl de agua libre de DNAsas/RNAsas que remplazarán en ese pocillo a los 5 µl de Ácidos Nucleicos en el momento de dispensarlos en la Placa de RT-PCR. El tubo Aqua-A (tapón **azul**) suministrado con el kit puede utilizarse para esto. Se recomienda realizar este control durante el primer uso de Cada kit o para verificar la ausencia de contaminación en la Master Mix debido a un resultado que no cumple con el NCS.

- **Control Positivo de Amplificación de la Cepa Vacunal Suvaxyn® y de las cepas PRRSV EU otras que Suvaxyn® (EPC)** : es ADN sintético (tubo **EPCPRRSVDIVA-B**, tapón **rojo**), que contiene las secuencias diana específicas de la Cepa vacunal Suvaxyn® y de PRRSV EU Otras que Suvaxyn®. Este control es obligatorio excepto en el caso que se use una Muestra Positiva de Proceso (MRI).

- **Control Artefacto**: es ADN sintético (tubo **CTLARTEFACT-A**, tapón **naranja**), que contiene las secuencias dianas específicas de la Cepa Vacunal Suvaxyn®. Este control hace posible evaluar la forma de la curva obtenida en la valencia "PRRSV EU otras que Suvaxyn" (señal FAM) en presencia de una concentración fuertemente positiva de la "cepa Vacunal Suvaxyn® (VIC), ya que la forma de esta curva FAM puede inducir una señal positiva falsa en FAM. Esta señal nos permitirá anular todas aquellas curvas FAM posteriores a este control en el caso de las muestras altamente positivas para la diana "Cepa vacunal Suvaxyn®". Este control es obligatorio. Se puede utilizar puro y diluido 1/100 000 (5 diluciones consecutivas a 1/10).

**⚠ ATENCIÓN:** *La manipulación del tubo EPC y del tubo Control Artefacto representa un riesgo de contaminación, se recomienda abrirlo y manejarlo solo, en una zona delimitada, lejos de los otros componentes y tomar las precauciones necesarias para evitar cualquier contaminación. Estos controles se deberían de mezclar con las muestras sólo en el momento en el que se dispensan en la placa de PCR.*

- Si está disponible, **Muestra Positiva de Proceso « centinela »**, MRI, idealmente es una muestra POSITIVA de sangre, suero u órganos con carga débil para las dos dianas objetivo. Esta muestra se extrae junto con las demás muestras en una o más copias (dependiendo del número de muestras analizadas). También se puede usar una muestra de sangre, órganos orales o fluidos, ligeramente POSITIVA para la valencia de PRRS EU otras que Suvaxyn. Después de la qRT-PCR, los valores de Ct de este control de extracción se informarán y rastrearán a lo largo del tiempo en un gráfico de control. El hecho de obtener, después de la extracción y qRT-PCR, los valores de Ct esperados con este control




positivo valida la totalidad del método. En este caso, el uso del EPC entregado con este kit ya no es obligatorio. BioSellal dispone de un MRI suero listo para su uso, positivo para la diana PRRSV EU otras que Suvaxyn® (MRI-PRRSV-001).

## 2) Preparación de la placa

### En la zona reservada a la preparación de la Master Mix «MIX»

1. Después de la descongelación, vortexear y centrifugar levemente cada uno de los tubos que contienen la MasterMix. **Transferir 20 µl de Master Mix** (tubo tapón **transparente**) a cada uno de los pocillos de interés (muestras y controles).

 La Master-Mix para RT-PCR de un solo paso es más frágil que Master Mix para PCR. Para garantizar el mantenimiento de su rendimiento, es obligatorio descongelar los tubos antes de usarlos, agitarlos justo antes de su uso y mantenerlos a 5 ° C ± 3 en el momento de depositarlos y volver a congelarlos inmediatamente después.

### En la zona dedicada a la carga de los Ácidos Nucleicos en la placa «Adición de los AN»

2. **Añadir 5 µl de los Ácidos Nucleicos extraídos (o NCS, agua, Muestra Positiva de proceso, Control Artefacto** (tubo **CTLARTEFACT-A** tapón **Naranja**) **o EPC** (tubo, tapón **rojo**) en el correspondiente pocillo, asegurándose de depositarlos bien en el fondo del pocillo, en contacto con el MasterMix y evitando que se formen burbujas.

*Nota* : en el caso que el IPC exógeno no se haya añadido a las muestras durante el proceso de extracción, es posible de añadir durante el proceso de carga de la placa de qRT-PCR:

- **Añadir 1 µl de IPC (tapón violeta) en todos y cada uno de los Ácidos Nucleicos Extraídos**
- o añadir directamente el IPC (1 µl por reacción) en un alícuota de MasterMix antes de dispensar 21 µl de en cada uno de los pocillos

En este caso, el volumen final de reacción será de 26 µl, sin tener impacto alguno en el rendimiento de la qRT-PCR.

3. Tapar la placa con el film óptico adhesivo o con los tapones ópticos correspondientes.

### En la zona dedicada a la amplificación por PCR: Zona «PCR»

4. **Programar el termociclador** (ver Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6)
5. Se recomienda **centrifugar la placa antes de introducirla en el termociclador**, esto permitirá evitar la presencia de gotas en las paredes y por tanto reducir enormemente las posibilidades de que se formen burbujas y facilitará el contacto entre la Master Mix y los Ácidos Nucleicos dispensados.
6. Arrancar el programa, que tiene una duración aproximada de 90 minutos.

### 3) Parámetros de funcionamiento del termociclador

Este kit ha sido desarrollado en AriaMx™ (Agilent Technologies, rampa rápida de forma predeterminada) y confirmado en ABI PRISM® 7500 Fast (Applied Biosystems) en rampa estándar. Para otros termocicladores, contacte con nuestro soporte técnico.

Tabla 2. Configuración del termociclador		
	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
<b>Modo</b>	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
<b>Rampa</b>	Rampa estándar	Rampa fast por defecto
<b>Referencia pasiva</b>	ROX	ROX

Tabla 3. Parámetros de funcionamiento del termociclador			
Diana	Detectores		Volumen final / pocillo
	Reporter	Quencher	
<b>PRRSV EU Otras que Suvaxyn®</b>	FAM	NFQ-MGB O None*	25 µl = 20 µl Master Mix + 5 µl de Ácidos Nucleicos o Controles†
<b>Cepa Vacunal Suvaxyn®</b>	VIC	NFQ-MGB O None*	
<b>IPC exógeno</b>	Cy5	NFQ-MGB O None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

\* elección variable según el termociclador que se usa, para resolver dudas contactar con el soporte Técnico de BioSellaal. (tech@biosellaal.com)

† Los controles son NC (agua), NCS (agua extraída), MRI, el Control Artefacto y el EPC.

Tabla 6. Parámetro del PROGRAMA PIG/AVIAN CON RT		
Rampa estándar		
Ciclos	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	20 min	50°C
1 ciclo	5 min	95°C
40 ciclos	10 sec	95°C
	45 sec	60°C
	+ adquisición de datos	

NB : El programa de amplificación es compatible con todos los kits de la gama PIG/AVIAN. .

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para analizar e interpretar las señales obtenidas después de qRT-PCR, es necesario colocar la línea de umbral, también llamada " threshold ". El threshold, debe ser colocado con cuidado para obtener los resultados más reproducibles entre las diferentes manipulaciones (parámetros especificados **en el Anexo C de la NF U47-600-1**). Para esto, se utiliza un conjunto coherente de señales positivas (CPE) y colocando la línea de umbral por encima del ruido de fondo y en la región de amplificación exponencial.

El ciclo umbral, llamado "Ct" o "Cq" (en función del termociclador utilizado), es la intersección entre las curvas de amplificación y la línea de umbral. Permite la medición relativa de la concentración objetivo en la reacción de RT-PCR cuando se analiza un extracto calibrado en la misma ejecución.

La serie de qRT-PCR se valida si los controles (EPC, Control Positivo de Proceso, NCS o NC) proporcionan resultados válidos, entonces el resultado de cada muestra se puede interpretar. Los resultados obtenidos en la valencia "PRRSV EU Otras que Suvaxyn®" en presencia de una señal positiva para la "Cepa Vacunal Suvaxyn®" deberán compararse con el **resultado obtenido para el "EPC" y el "Control Artefacto"**.

# Casos principales

## Lectura de los controles

Tabla 7. Posibles escenarios de resultados de los Controles

	Dianas			Interpretación
	PRRSV EU Otras que Suvaxyn® (FAM)	Cepa Vacunal Suvaxyn® (VIC)	IPC exógeno (Cy5)	
<b>NCS</b> Control Negativo de Proceso  <b>OBLIGATORIO</b>	Neg	Neg	Pos	<b>Validado</b>
	Al menos una de las dos dianas <b>Pos</b>		Pos	Contaminación con una Muestra Positiva durante la extracción o preparación de la placa.
	Neg	Neg	Neg <sup>§</sup>	¿ Ha olvidado añadir el IPC exógeno? Extracción no válida
<b>NC</b> Control Negativo de Amplificación  <b>FACULTATIVO</b>	Neg	Neg	Neg <sup>§</sup>	<b>Validado</b>
	Al menos una de las tres valencias <b>Pos</b>			Contaminación con una muestra Positiva/Negativa durante la extracción o preparación de la placa o contaminación en la MasterMix.
<b>EPC</b> Control Positivo de Amplificación de la Cepa Vacunal Suvaxyn® y de PRRSV EU Otras que Suvaxyn®  <b>OBLIGATORIO</b> <i>EN AUSENCIA DE UN CONTROL POSITIVO DE PROCESO</i>	Pos*	Pos*	Neg <sup>§</sup>	<b>Validado</b>
	Neg	Neg	Neg <sup>§</sup>	Problema durante qRT-PCR: ¿Error de Master Mix? ¿Ha olvidado añadir el EPC?
	Pos*	Pos*	Pos	Contaminación por una muestra durante la preparación de la placa.
<b>Control de Artefacto</b> Control Negativo de la señal de las PRRSV EU Otras que Suvaxyn®  <b>OBLIGATORIO</b>	Señal no específica/Neg	Pos*	Neg <sup>§</sup>	<b>Validado</b>
<b>Control Positivo de Proceso MRI</b>  <b>RECOMENDADO</b> <i>SI DISPONIBLE</i>	Pos <sup>†</sup>	Pos <sup>†</sup>	Pos <sup>‡</sup>	<b>Validado</b>
	Neg	Neg	Neg <sup>§</sup>	Problema durante qRT-PCR: ¿Error de Master Mix? ¿Se olvidó la adición de ácidos nucleicos o no ha habido contacto de éstos con la Master Mix durante la preparación de la placa? Derivado del proceso: extracción y / o qRT-PCR? ¿Degradación de la muestra control?
	Neg	Neg	Pos <sup>‡</sup>	¿Degradación de la muestra control? Derivado del proceso: extracción

\* El valor de Ct obtenido debe estar de acuerdo con el valor dado en el certificado de análisis (CA).

† El valor de Ct doiti debe estar compreso enyre los mimites de la carta de control.

‡ Se puede observar una ligera señal positiva del IPC, que no deberá ser nunca inferior a Ct 35.

§ El valor del Ct obtenido dependerá del termociclador, de la matriz analizada y de los métodos de extracción utilizados. Debe estar, como máximo, dentro del rango especificado en el Certificado de análisis (CA). Los valores de IPC, obtenidos de las diferentes matrices con los métodos propuestos por BioSellal, están disponibles a pedido. BioSellal recomienda que el laboratorio determine su propio valor de IPC máximo permisible en función de su método de extracción y su termociclador.

## Lectura de las muestras

Tabla 8. Diferentes tipos de resultados que puede obtenerse de las muestras

Diana			
PRRSV EU Otras que Suvaxyn® (FAM)	Cepa Vacunal Suvaxyn® (VIC)	IPC exógeno (Cy5)	Interpretación
Neg <sup>‡</sup>	Pos	Pos*	<b>Positivo o Detectado</b> Presencia de la cepa vacunal Suvaxyn®
Pos	Neg <sup>‡</sup>		<b>Positivo o Detectado</b> Presencia de cepa PRRSV EU otras que Suvaxyn®
Pos	Pos		<b>Positivo o Detectado</b> Presencia de cepa PRRSV EU otras que Suvaxyn® yd e la cepa vacunal Suvaxyn®
Pos	Pos	<b>Neg ó Ct&gt;35</b>	<b>Positivo o Detectado</b> ¿ Ha olvidado añadir el IPC exógeno? ¿Presencia de inhibidores <sup>†</sup> ? ¿Competición con alguna de las dianas?
Una de las dos dianas Neg <sup>‡</sup>		<b>Neg ó Ct&gt;35</b>	<b>Positivo o Detectado para la valencia Positiva</b> <b>No interpretable = repetir el análisis.</b> <b>Para la diana Negativa</b> ¿ Ha olvidado añadir el IPC exógeno? Durante la extracción o durante la qRT-PCR. ¿Presencia de inhibidores <sup>†</sup> ? ¿Degradación de los AN en la muestra? ¿Problema durante la extracción? ¿Competición con alguna de las dianas?
Neg	Neg	<b>Neg ó Ct&gt;35</b>	<b>No interpretable = repetir el análisis</b> ¿Se olvidó la adición de ácidos nucleicos o no ha habido contacto de éstos con la Master Mix durante la preparación de la placa? ¿Presencia de inhibidores <sup>†</sup> ? ¿Degradación de los AN en la muestra? ¿ Ha olvidado añadir el IPC exógeno? ¿Problema durante la extracción?

\* El valor de Ct obtenido depende del termociclador, la matriz analizada y los métodos de extracción utilizados. Debe estar, como máximo, dentro del rango especificado en el Certificado de análisis (CA). Los valores de IPC, obtenidos de las diferentes matrices con métodos validados por BioSellal, están disponibles a pedido. BioSellal recomienda que el laboratorio determine su propio valor de IPC máximo permisible en función de su método de extracción y su termociclador.

† Si existe una sospecha de inhibición, 1) Repita el qRT-PCR prediluyendo los ácidos nucleicos extraídos a 1/10 o incluso 1/100 en agua libre de DNasa / RNasa o 2) Repita el análisis des de la extracción.

‡ Los datos obtenidos por BioSellal durante la validación del kit Bio-T<sup>®</sup> PRRSV DIVA demostraron un fenómeno de competencia entre las dos dianas. De hecho, cuando una muestra es muy positiva para una de las dos dianas, la sensibilidad de detección del otro objetivo se ve afectada. Además, en el caso de un resultado altamente positivo para PRRSV EU o Suvaxyn®, existe el riesgo de que no se detecte la cepa vacunal Suvaxyn® en una pequeña cantidad. El resultado negativo para la cepa vacunal Suvaxyn® se debe interpretar de acuerdo con el estado de vacunación de los animales (fecha y protocolo de vacunación, fecha de recolección de la muestra ...). A la inversa, en caso de un resultado altamente positivo para cepa Vacunal Suvaxyn®, existe el riesgo de que no se detecte una cepa PRRSV EU otras Suvaxyn® en pequeñas cantidades. El resultado negativo para la valencia de PRRSV EU de que Suvaxyn® debe interpretarse de acuerdo con el contexto epidemiológico (fecha de vacunación, circulación viral ...). Es posible identificar la presencia de un cepa de Suvaxyn® vacunal y de un PRRSV EU cepa que no sea Suvaxyn® dentro de la misma muestra utilizando la secuenciación NGS. Póngase en contacto con BioSellal para obtener más información. También se puede considerar que realice un nuevo muestreo después de la fecha de vacunación.

## Particularidades del kit BIOTK077 y BIOTK086

<p><b>Presencia de una señal FAM falsamente Positiva en presencia de cepa vacunal Suvaxyn®</b></p>	<p>Nótese que en presencia de la cepa vacunal Suvaxyn®, una ligera señal para la diana PRRS EU otras que Suvaxyn® puede ser observada. Con el propósito de reforzar el análisis y la interpretación de los resultados, un tubo Control Artefacto (tubo tapón <b>naranja</b>) es suministrado con el kit Bio-T kit® PRRSV DIVA. Se recomienda analizar un rango de dilución de este Control de Artefacto para verificar la ausencia de artefactos en FAM o para establecer el ritmo de señal de este artefacto y, por lo tanto, negativar, en caso de una muestra positiva en la diana Cepa vacunal Suvaxyn® todas las curvas obtenidas en la valencia de PRRSV EU otras que Suvaxyn® que aparecen más tarde o al mismo nivel que este control.</p>
<p><b>Evaluación del efecto de competición entre dianas</b></p>	<p>Durante la validación de Bio-T kit® PRRSV DIVA, se identificó un fenómeno de competencia entre los objetivos de Cepa Vacunal Suvaxyn® y el de PRRS EU Otras que Suvaxyn®. La evaluación del impacto de este efecto inhibitorio sobre la detectabilidad del kit ha demostrado:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Detectabilidad equivalente en el caso de concentración equimolar de las dos dianas (cepas PRRSV EU otras que Suvaxyn® y Cepa Vacunal Suvaxyn®).</li><li>- Detectabilidad similar en el caso de una mezcla cercana de los dos tipos de cepas (PRRSV EU otras de Suvaxyn® y Cepa Vacunal Suvaxyn®). Es decir, cuando el valor de Ct de la diana PRRS EU Otras que Suvaxyn es inferior al de la Cepa vacunal Suvaxyn® en el rango de 27 a 29, la presencia de una gran cantidad de cepa vacunal Suvaxyn® (Ct ≈ 25) tiene un impacto limitado en la detectabilidad. También cuando el valor de Ct en Suvaxyn® cepa vacunal es del orden de 28, la presencia de una gran cantidad de cepas PRRSV EU como Suvaxyn® (Ct ≈ 25) tiene un impacto limitado en la detectabilidad.</li><li>- Una pérdida de detectabilidad cuando uno de las dos dianas se haya en cantidad pequeña (Ct &gt; 29), mientras que la de la otra diana se haya en elevada concentración alta (Ct ≈ 25). Esta pérdida de detectabilidad es en promedio de 4 Ct y puede conducir a la no detección de la diana que se encuentra en pequeña concentración.</li></ul>

Notas :

**Fabricado por:**

**biosejal**

**[www.biosellal.com](http://www.biosellal.com)**

**Soporte Técnico**

**[tech@biosellal.com](mailto:tech@biosellal.com)    +33 (0) 4 26 78 47 62**

**Distribuido por:**



**Informaciones y Pedidos España**

**[contact@biosellal.com](mailto:contact@biosellal.com)    +33 (0) 4 26 78 47 60**

