



ADIAPURE™ TLB

KIT D'EXTRACTION EN LYSE RAPIDE SUR BOUCLES AURICULAIRES DE BOVINS
POUR LA DETECTION DU VIRUS DE LA DIARRHEE VIRALE BOVINE PAR
AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN TEMPS REEL (TEST RT-PCR)

Références :

ADIADP10E1-100 (100 extractions)

ADIADP10E1-400 (400 extractions)



ADIAPURE™ TLB

I.	HISTORIQUE DES REVISIONS	3
II.	INFORMATIONS GENERALES	4
1.	But de l'essai	4
2.	Description et principe du test.....	4
III.	MATERIEL ET REACTIFS.....	5
1.	Réactifs fournis dans le kit.....	5
2.	Validité et conservation.....	5
3.	Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit	5
IV.	TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....	6
1.	Précautions.....	6
2.	Conservation des échantillons et des extraits d'ARN	6
3.	Témoins à inclure	6
V.	EXTRACTION ADIAPURE™ TLB	7
1.	Préparation du cartilage auriculaire	7
2.	CLASSIC LYSIS protocol.....	7
3.	FAST LYSIS protocol.....	7
4.	EASY LYSIS protocol	8
VI.	AMPLIFICATION.....	9
VII.	INDEX DES SYMBOLES.....	10

I. Historique des révisions

N/A	Non Applicable (première publication)
Correction	Correction des anomalies du document
Modification technique	Addition, révision et/ou suppression d'information liée au produit
Administratif	Modifications non techniques notables pour l'utilisateur

NB : toute modification mineure, typographique, grammaticale et de mise en page ne figurent pas dans l'historique des révisions.

Date d'édition	Référence	Type de révision	Révision apportée
2020/07	NF10E1-01	N/A	Première publication
2020/11	NF10E1-02	Modification technique	Ajout 2 nouveaux protocoles de lyse individuelle (FAST LYSIS protocol & EASY LYSIS protocol)

II. Informations générales

1. But de l'essai

Le kit d'extraction ADIAPURE™ TLB permet d'obtenir, par lyse rapide, des extraits d'acides nucléiques à partir de biopsie auriculaire de bovin. Les extraits ainsi obtenus permettent la détection du Virus de la Diarrhée Bovine Virale (BVDV) et du Virus de la Maladie des Frontières (BDV) avec les kits d'amplification ADIAVET™ spécifiques.

2. Description et principe du test

Ce kit repose sur la lyse rapide du cartilage auriculaire et du matériel génétique contenus dans celui-ci. Les acides nucléiques ainsi libérés peuvent alors être utilisés sans purification pour la détection du virus BVDV.

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Biopsie auriculaire	☒	25

*Pour les laboratoires réalisant des analyses dans le cadre d'une qualification d'animaux non IPI (exemple : garantie ACERSA en France). Les Laboratoires Nationaux de Référence autorisent des tailles de mélanges définies ainsi que des techniques d'extraction définies. Se conformer à la législation en vigueur de votre pays ou auprès de l'organisme certificateur.

III. Matériel et réactifs

1. Réactifs fournis dans le kit

REF ADIADP10E1-100

L1	Tampon de lyse	1 x 30 ml flacon
L2*	Réactif de lyse	2 x 1000 µl tubes à bouchon jaune

REF ADIADP10E1-400

L1	Tampon de lyse	1 x 125 ml flacon
L2*	Réactif de lyse	1 x 9 ml flacon

* Réactif contenant une substance à une concentration considérée dangereuse : Proteinase K, 1,00%

Mention d'avertissement : **DANGER**



H334

P261 / P280 / P342 + P311

Mention du danger :

H334 : Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation : Sensibilisation respiratoire Catégorie 1

Conseil de prudence :

P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.

P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P342+P311 : En cas de symptômes respiratoires : Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.

Note :



Une forme de diamant noir peut apparaître sur l'étiquettes. Lorsqu'il se trouve à côté d'un symbole de danger, lire le symbole de danger et les phrases standardisées H de risque et P de conseils de prudence. Autrement, ne pas le considérer comme un symbole.

2. Validité et conservation

A réception, le kit doit être stocké à **2/8°C**. Pour une meilleure stabilité, il est recommandé de conserver le réactif L2 à une température inférieure à -15°C.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

3. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

Attention : le consommable utilisé doit être Nuclease-free (par exemple autoclavé deux fois 25 minutes à +120°C ou une fois 60 minutes à +121°C)

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II
- Appareil d'homogénéisation pour tubes de type vortex
- Pipettes de 1 - 10 µl, 20 - 200 µl et 200 - 1000 µl
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 ml et 2 ml
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 ml
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant

Bloc chauffant spécifique aux tubes collecteur Allflex, BVD HeatLyse System de Bio-X Diagnostics, comprenant :

- Grant dry heating unit. Ref. NQBD2-EU
- Removable Allflex BVD heat block. Ref. N96Bloc05ML
- Allflex BVD 4*96 grippable sockets. Ref. N96TPACK

IV. Traitement des échantillons et des témoins

1. Précautions

Avant de commencer l'essai, lire l'ensemble du protocole et le respecter scrupuleusement.

Nous conseillons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude et la précision des micropipettes utilisées. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire.

Les échantillons à analyser doivent être manipulés et éliminés comme des déchets biologiques. **Prendre toutes les dispositions de sécurité et de confinement requises pour la manipulation des agents biologiques concernés.**

2. Conservation des échantillons et des extraits d'ARN

Les échantillons se conservent un ou deux jours à +2/8°C. **Exception faite des cartilages auriculaires en présence de dessiccants** qui peuvent être stockés à 2/8°C plusieurs semaines, tous les échantillons qui ne peuvent pas être traités dans les 48 heures doivent être stockés à <-15°C à réception.

Les ARN extraits sont des molécules sensibles. Les lysats peuvent être stockés dès la fin de l'extraction sur glace ou à +2/8°C pendant quelques heures, puis doivent être conservés à <-15°C.

3. Témoins à inclure

Plusieurs témoins devront être inclus lors de chaque série d'extraction.

La combinaison de ces différents témoins permet la validation de l'ensemble des étapes du processus analytique (extraction+amplification), quelles que soient les matrices.

Le contrôle interne endogène (RNaseP) naturellement présent dans les cellules de l'animal permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés :

- **Témoin négatif d'extraction (obligatoire)**

Afin de s'assurer de l'absence d'inter-contamination, au moins un témoin négatif doit être intégré dans chaque série d'extraction (à titre d'exemple la norme U47-600 recommande un témoin négatif de processus analytique par centrifugation de 24 colonnes ou 4 témoins négatifs de processus analytique par plaque 96 puits). Ce témoin pourra être réalisé avec une matrice négative ou du tampon de dilution.

- **Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)**

Un témoin positif « cible » peut être introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant du virus BVDV. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution du virus BVDV. Ce témoin positif cible parfois nommé sentinelle permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

Un **témoin positif cible d'extraction** peut vous être fourni. Il est réalisé à partir d'une culture virale inactivée et lyophilisée, calibrée entre 1 et 100xLD méthode. (ADIAVET™ BVDV Extraction Positive Control Réf. : ADI105-8).

Ce témoin peut être utilisé **comme sentinelle** sans ajout d'une biopsie auriculaire négative.

V. Extraction ADIAPURE™ TLB

Trois protocoles d'extraction sont proposés pour la lyse rapide des boucles auriculaires avec le kit ADIAPURE™ TLB :

	CLASSIC LYSIS protocol	FAST LYSIS protocol	EASY LYSIS protocol
Préparation	1 cartilage auriculaire + 280 µl tampon L1 TLB + 20 µl tampon L2 TLB		
Incubation	20 minutes à +65°C	8 minutes à +65°C	10 minutes à +95°C
	15 minutes à +95°C	8 minutes à +95°C	
Amplification	5 µl d'extraits ARN sont utilisés pour l'amplification avec le kit PCR ADIAVET compatible		

1. Préparation du cartilage auriculaire

Ejecter le cartilage auriculaire dans le tube collecteur à code-barre de la boucle d'oreille.

Ajouter

- 280 µl de lysis buffer L1 TLB*
- 20 µl de lysis buffer L2 TLB*.

**Un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé.*

Distribuer alors 300 µl du pré-mix par échantillon.

Ce pré-mix est stable jusqu'à 5 jours à +2/8°C.

Filmer et homogénéiser.

Réaliser l'un des 3 options d'incubation proposés.

2. CLASSIC LYSIS protocol

Incuber :

- 20 minutes à +65°C
- 15 minutes à +95°C
- Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs (par exemple, 15-30 minutes à température ambiante ou 5-20 minutes à +2/8°C, selon le nombre d'échantillons analysés)

Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, 50 µl de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.

En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement peut être conservée à +2/8°C pendant 24 heures, au-delà stocker à <-15°C.

3. FAST LYSIS protocol

Incuber :

- 8 minutes à +65°C
- 8 minutes à +95°C
- Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs (par exemple, 15-30 minutes à température ambiante ou 5-20 minutes à +2/8°C, selon le nombre d'échantillons analysés)

Possibilité de faire des pools, jusqu'à 10, en mélangeant, par exemple, 50 µl de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.

En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement peut être conservée à +2/8°C pendant 24 heures, au-delà stocker à <-15°C.

4. EASY LYSIS protocol

Incuber :

- **10 minutes à +95°C**
- **Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs** (par exemple, 15-30 minutes à température ambiante ou 5-20 minutes à +2/8°C, selon le nombre d'échantillons analysés)

*Possibilité de faire des pools, jusqu'à 10, en mélangeant, par exemple, **50 µl** de chaque solution obtenue individuellement. Homogénéiser.*

En vue d'une nouvelle analyse, chaque solution obtenue individuellement peut être conservée à +2/8°C pendant 24 heures, au-delà stocker à <-15°C.

VI. Amplification

Pour l'amplification des acides nucléiques extraits, se reporter aux paragraphes « Amplification » et « Interprétation des résultats » des manuels d'instruction ADIAVET™ du pathogène concerné.

VII. Index des symboles

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limite supérieure de température
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests
	Conserver à l'abri de la lumière
	Pour usage vétérinaire in vitro uniquement – Pour usage animal uniquement

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE, ADIAPURE™ et ADIAVET™ sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à ADIAGENE et/ou Bio-X Diagnostics ou à l'une de ses filiales, ou à une de ses sociétés. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document appartiennent à leurs propriétaires respectifs.



**S.A.R.L. ADIAGENE**
9, rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

RCS 417 876 299
Tel. +33 (0)2 96 68 40 20
www.biox.com