

Adia^X Pure

ADIAPURE LYSIS FLEX

Référence : ADPLF1-500

Kit d'extraction en lyse directe pour la détection d'acides nucléiques par amplification enzymatique de gène en temps réel (test PCR), compatible avec la gamme PCR ADIALYO™

Extraction kit – 500 mL

Usage strictement vétérinaire



Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADPLF1-500
		500 mL
LF1	Tampon de lyse	5 x 100 mL
L2	Protéinase K	1 x 1,1 mL
LF3	Tampon de lyse	1 x 28 mL

Historique de révision

Date	Version	Modifications
2024/03	NFLF1-04	Recherche de <i>Mycobacterium avium</i> paratuberculosis à partir de fèces
2025/01	V01	Nouvelle mise en page. Recherche d' <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> à partir d'écouvillons. Ajout protocoles à partir d'échantillons de porc pour la recherche d'ASFV, <i>Lawsonia intracellularis</i> , <i>Brachyspira</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> et <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .

Note : les modifications mineures concernant la typographie, la grammaire et la mise en forme ne sont pas incluses dans l'historique des révisions.

Protocoles validés



Pathogène recherché	Carte FTA §F	Ecouvillon §G.1.a
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	X	X
<i>Mycoplasma synoviae</i>		
<i>Mycoplasma meleagridis</i>		
<i>Mycoplasma iowae</i>		
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>		
Virus Bronchite Infectieuse Virus Influenza		



Pathogène recherché	Sang sur			sérum	Organe/ Tissu			Fèces			Chiffonnette	Ecouvillon/ rossette	Lavage trachéobronchique	Carte FTA
	Ani- coagulant	écouvillon	Buvard		Broyage	Ecouvillon	Biopsie	1g fèces	Ecouvillon	ADIAPREP				
Virus Influenza												X		
<i>Lawsonia intracellularis</i>					X	X		X	X	X	X	X		
<i>Brachyspira spp.</i>					X	X		X	X	X	X	X		
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>					X	X						X	X	X
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>							X					X		
Virus de la peste porcine africaine (ASFV)	X	X	X	X	X									



Pathogène recherché	Fèces ADIAPREP §G.1.g
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	X

A. Principe du test

Le kit d'extraction ADIAPURE™ LYSIS FLEX permet d'obtenir par lyse directe des extraits d'acides nucléiques. Il contient l'ensemble des tampons nécessaires à l'extraction d'acides nucléiques à partir de différentes matrices. Les acides nucléiques ainsi libérés peuvent alors être utilisés sans purification pour la détection des pathogène par les kits d'amplification ADIALYO™.

B. Conditions de stockage

Dès réception, le kit doit être placé à +2/8 °C, à l'abri de la lumière. Pour une meilleure stabilité, il est recommandé de conserver le réactif L2 à une température inférieure à -15 °C.

Dans ces conditions, l'ensemble des réactifs est stable au moins 1 an. Ne pas mélanger les réactifs de kits de lots différents.

C. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Poste de Sécurité Microbiologique de type II.
- Centrifugeuse pour microtubes.
- Vibrobroyeur à billes (Mixer Mill ou Fast Prep).
- Bloc chauffant ou thermocycleur.
- Plaques PCR et films aluminium (pour étapes de chauffages en thermocycleur).
- Appareil d'homogénéisation pour tubes.
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL.
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes.
- Microtubes Nucléase-free.
- Lames de scalpel.
- Gants latex ou nitrile non poudrés.
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/L).
- Tampon PBS 1X.
- Système de pré-filtration ADIAPREP (Bio-X Diagnostics, réf. ADPREP-200 (200 tests)).
- Billes de métal de broyage 3 mm pour le vibrobroyeur à billes de type Mixer Mill.
- Billes de verres de broyage pour le vibrobroyeur à billes de type Mixer Mill :
 - ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBIA-480 (480 tests)).
 - ADIAPURE™ GLASS BEADS RACKS 4x96 (Bio-X Diagnostics, réf. ADPBIAR-4x96 (384 tests)).

D. Précautions d'utilisation et de sécurité

- Pour usage vétérinaire *in vitro* uniquement.
- Pour usage animal uniquement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Lire l'ensemble du protocole avant de commencer et le respecter scrupuleusement.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption du kit.
- Ne pas utiliser les réactifs dont l'emballage est détérioré.
- Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas ouvrir les tubes PCR après amplification.
- Éliminer le matériel utilisé en respectant la législation en vigueur en matière de protection de l'environnement et de gestion des déchets biologiques.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

E. Témoins à inclure

L'emploi de témoins permet de contrôler la fiabilité des résultats. Les témoins sont inclus par série d'analyse selon les recommandations définies par les normes en vigueur (Cf. AFNOR U47-600...).

Contrôles	Validation de	Mode opératoire
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{Méthode}) par série d'extraction

F. Extraction des acides nucléiques à partir de carte FTA

Protocole Carte FTA
Couper un morceau de 3 mm ² de carte FTA. Placer-le dans un microtube. Ajouter 100 µL de tampon LF1 , homogénéiser 10 secondes et jeter le liquide. Ajouter 100 µL de tampon LF3 , homogénéiser 10 secondes et jeter le liquide. Ajouter 100 µL de tampon LF3 , homogénéiser 10 secondes et incuber 5 minutes à +95°C . Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs. <i>Rem : ajouter 0,5 µL d'EPC-Ext/puits PCR lors de l'étape d'amplification pour les kits concernés.</i>

G. Extraction des acides nucléiques à partir de matrices animales

1. Préparation de l'échantillon

a. A partir d'écouvillons

Écouvillons aviaires

- Couper **1 à 6 écouvillons** au ras du coton dans un tube à hémolyse de 5 mL.
- Ajouter **1 mL de tampon LF1** s'il s'agit d'une analyse de 1 à 3 écouvillons ou **2 mL de tampon LF1** s'il s'agit d'une analyse de 4 à 6 écouvillons.
- Homogénéiser.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

Écouvillons/brossettes porcins

- Couper **1 à 3 écouvillons** au ras du coton dans un tube.
- Ajouter **1 mL de tampon LF1** et homogénéiser.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

b. A partir de sang

Sang sur anticoagulant

- Transférer **100 µL sang** dans **400 µL de tampon LF1** et homogénéiser.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

Écouvillon de sang

- Couper **l'écouvillon de sang** au ras du coton dans un tube.
- Ajouter **1 mL de tampon LF1** et homogénéiser.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

Sang sur buvard Whatman 3

- Découper **5 disques** dans un microtube et ajouter **1 mL de tampon LF1**.
 - Homogénéiser et **incuber 10 à 15 minutes** à température ambiante.
 - Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».
- c. **A partir de sérum**
- Utiliser **50 µL de sérum** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

d. A partir d'organe/tissu

Protocole Broyage	Protocole Ecouvillon de tissu
Placer 20 à 100 mg d'échantillon dans un microtube. Ajouter 1 mL de tampon LF1 . Broyer (par exemple, à l'aide d'un Mixer Mill : ajouter 1 bille de métal (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz). Centrifuger 6 000 g/2 minutes. Utiliser 50 µL de suspension pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».	Frotter un écouvillon sec sur l'organe. Couper l'écouvillon dans 1 mL de tampon LF1 et homogénéiser. Utiliser 50 µL de suspension pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

Protocole Biopsie

Placer **une biopsie** dans **1 mL de tampon LF1** et homogénéiser.

Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

e. A partir de lavage trachéo-bronchique

- **Centrifuger 1 mL de lavage trachéo-bronchique** à 10 000 g pendant 30 minutes.
- Eliminer le surnageant puis **ajouter 200 µL de tampon LF1**. Homogénéiser.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

f. A partir de chiffonnette

- Ajouter **40 mL de PBS1X ou eau physiologique** dans la chiffonnette sèche. Malaxer.
- **Centrifuger 1 mL de suspension** à 1000 g pendant 10 minutes.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

g. A partir de fèces

Protocole 1 g de fèces	Protocole Ecouvillon
Peser 1 g de fèces et transférer dans 5 mL PBS1X ou eau physiologique . Homogénéiser. Utiliser 50 µL de suspension pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».	Plonger un écouvillon sec le pot de fèces. Couper 1 écouvillon au ras du coton dans un tube. Ajouter 1 mL de tampon LF1 et homogénéiser. Utiliser 50 µL de suspension pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

Protocole ADIAPREP

- Prélever 1 cuillère de matière fécale à l'aide du dispositif ADIAPREP.
- Araser la cuillère et la réintroduire dans le dispositif.
- Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène.
- Transférer 1 mL dans un microtube, une barrette ou une plaque 96 puits.
- Centrifuger 5 minutes à 3 000 g et éliminer le surnageant.
- Ajouter au culot 300 mg de billes de verres de broyage (par exemple ADIAPURE ALIQUOTED GLASS BEADS) et **500 µL de tampon de lyse LF1**.
- Broyer 5 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 secondes sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 3 000 g.
- Utiliser **50 µL de suspension** pour la prochaine étape § « Lyse de l'échantillon ».

2. Lyse de l'échantillon

Pour chaque échantillon :

- Préparer préalablement **50 µL de tampon LF3 + 2 µL de tampon L2**, et **5 µL d'EPC-Ext** pour les kits concernés, dans un microtube ou un puits PCR.

Extemporaneément, un pré-mix contenant les réactifs peut être réalisé puis distribué pour chaque échantillon.

- Ajouter **50 µL d'échantillon préparé**.
- Fermer et Homogénéiser.
- Incuber **5 minutes à +65 °C** puis **15 minutes à +95 °C** dans un bloc thermique adapté (type bloc chauffant ou thermocycleur).
- Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs.
- Utiliser **5 µL** d'extraits pour l'amplification PCR (se référer § « Amplification ».)

H. Conservation des acides nucléiques

Après extraction, les acides nucléiques extraits peuvent être conservés à +2/8 °C pendant quelques heures avant utilisation. Pour une conservation plus longue, ils doivent être conservés à une température inférieure à -15 °C ou -65 °C.

I. Amplification

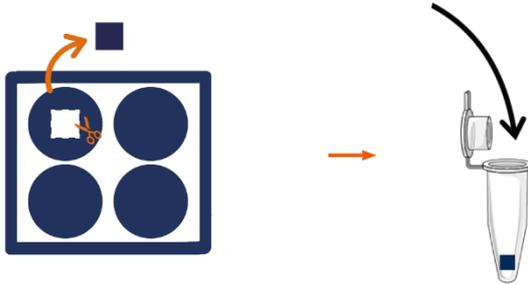
Pour l'amplification des acides nucléiques, se référer aux chapitres « Protocole d'amplification » et « Lecture et interprétation » de la notice d'utilisation du kit ADIALYO™ du pathogène d'intérêt.

Table des symboles

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

Extraction from FTA card

1 Cut a 3 mm² piece of the FTA card.
Place it in a microtube.



2 Add 100 µL of LF1 buffer,
vortex 10 sec and discard the liquid



3 Add 100 µL of LF3 buffer,
vortex 10 sec and discard the liquid



4 Add 100 µL of LF3 buffer,
vortex 10 sec and
incube 5 minutes at 95°C

