# ADIAPURE™ Lysis FLEX

**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™**

**Référence :**
ADPLF1-500

VET

**NFLF1-04**
**2024/03**

# ADIAPURE™ Lysis FLEX


HISTORIQUE DES REVISIONS ..... 3

I. INFORMATIONS GENERALES ..... 4

1. Principe du kit ..... 4
2. Description du test ..... 4

II. 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

III. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS ..... 6

1. Précautions ..... 6
2. Conservation des extraits d'acides nucléiques ..... 6
3. Préparation des témoins ..... 6
   *A. Témoin négatif d'extraction (obligatoire) ..... 6*
   *B. Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé) ..... 6*

IV. PROTOCOLE D'ANALYSE ..... 7

1. Extraction à partir d'écouvillon ..... 7
2. Extraction à partir de carte FTA ..... 7
3. Extraction à partir de fèces et de prélèvement environnementaux (raclage de bouse) ..... 8
4. Amplification ..... 8

V. INDEX DES SYMBOLES ..... 9

# 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 mise en page, ne figurent pas l'historique des révisions

| **Date d'édition** | **Référence** | **Type de révision** | **Révision apportée** |
|---|---|---|---|
| 2020/05 | NFLF1-01 | N/A | Première publication |
| 2023/06 | NFLF1-02 | Technique | Recherche des virus Influenza et Bronchite Infectieuse à partir d'écouvillons |
| 2023/10 | NFLF1-03 | Technique | ajout protocole à partir de carte FTA |
| 2024/03 | NFLF1-04 | Technique | Recherche de *Mycobacterium avium paratuberculosis* à partir de fèces |

# I. Informations générales

## 1. Principe du kit

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**™.

## 2. Description du test

Adiagène a validé le kit ADIAPURE™ Lysis FLEX à partir de diverses matrices pour la détection de différents pathogènes de la gamme PCR **ADIALYO**™.
Le tableau ci-dessous résume les protocoles validés.

| | | Ecouvillon | Carte FTA | Fèces / Prélèvement environnemental (Raclage de bouse) |
|---|---|---|---|---|
| ***Maladies aviaires*** | *Mycoplasma gallisepticum* | X | X | |
| | *Mycoplasma synoviae* | X | X | |
| | *Mycoplasma meleagridis* | X | X | |
| | *Mycoplasma iowae* | X | X | |
| | Virus Influenza | X | X | |
| | Virus Bronchite Infectieuse | X | X | |
| ***Maladies des ruminants*** | *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* | | | X |

Pour la taille des pools, se référer à la notice du kit ADIALYO™ concerné.

# II. Matériel et réactifs

## 1. Réactifs fournis dans le kit

| REF ADPLF1-500 | | |
|---|---|---|
| LF1 | tampon de lyse | 5 x 100 mL flacons (Réactif prêt à l'emploi) |
| L2 | Enzyme | 1 x 1,1 mL tube (Réactif prêt à l'emploi) |
| LF3 | tampon de lyse | 1 x 28 mL flacon (Réactif prêt à l'emploi) |

## 2. Validité et conservation

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.**

## 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.
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant.
- Appareil d'homogénéisation pour tubes de type vortex.
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 - 1000 µL.
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes.
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 mL et 2 mL.
- Tubes stériles de 5, 10 ou 15 mL.
- Gants latex ou nitrile non poudrés.
- Système de pré-filtration :
    - ADIAPREP (Bio-X Diagnostics, réf. ADPREP-200 (200 tests)).
- Billes 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)).

  Pour le vibrobroyeur à billes de type Fast Prep ou Ribolyser
    - Lysing Matrix B (MP biomedicals, 100 tubes, réf. 116911100).

# III. Traitement des échantillons et des témoins

## 1. Précautions

**Important :**
Préparer les tampons contenus dans les kits conformément à la notice §II.2.
Les tampons peuvent contenir des substances toxiques, veuillez consulter la fiche technique de sécurité MSDS.
Les températures de stockage doivent être respectées.

Nous conseillons vivement que cet essai soit réalisé par des personnes ayant reçu une formation appropriée. Vérifier l'exactitude des micropipettes utilisées. La qualité des résultats dépend du respect scrupuleux des bonnes pratiques de laboratoire.
La réaction PCR génère de grandes quantités d'ADN amplifié. Quelques molécules de produits amplifiés peuvent générer des résultats positifs. Il est donc important de ne pas ouvrir les tubes après amplification.
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.**
Nous vous recommandons de lire l'ensemble du protocole avant de commencer l'essai et de le respecter scrupuleusement.

## 2. Conservation des extraits d'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.

## 3. Préparation des témoins

Plusieurs témoins devront être inclus lors de chaque série d'extraction.
La combinaison de différents témoins permet la validation de l'ensemble des étapes du processus analytique (extraction + amplification), quelles que soient les matrices.

- Le contrôle interne endogène ou exogène selon le kit ADIALYO™ permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « positive control » inclus dans le kit de diagnostic ADIALYO™ du pathogène d'intérêt permet de valider l'amplification de la cible.

D'autres témoins doivent ou peuvent être ajoutés :

### A. 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 AFNOR NF 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, par exemple du tampon de dilution.

### B. Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)

Un témoin positif « cible » est introduit par série d'extraction. Il s'agit d'un échantillon contenant le pathogène d'intérêt. Celui-ci pourra être obtenu à partir d'un prélèvement positif disponible au laboratoire, ou d'un prélèvement négatif dopé par une solution du pathogène d'intérêt. Ce témoin positif cible (parfois nommé sentinelle) devra être proche de la $LD_{METHODE}$ (par exemple, entre 1 et 100 X $LD_{METHODE}$). Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

# IV. Protocole d'analyse

⚠ Chaque tampon du kit doit être préalablement vortexé avant utilisation.

## 1. Extraction à partir d'écouvillon

| Echantillons | Mycoplasmes / Virus Influenza / Virus Bronchite Infectieuse |
|---|---|
| **Préparation** | Couper **1 à 6 écouvillons** au ras du coton dans un tube à hémolyse de 5 mL.<br>Ajouter **1 mL de tampon LF1** s'il s'agit d'une analyse de 1 à 3 écouvillons.<br>**ou 2 mL de tampon LF1** s'il s'agit d'une analyse de 4 à 6 écouvillons.<br>Vortexer vigoureusement 10 secondes / tube.<br>Transférer **50 µL du surnageant** dans un microtube ou dans un puits de plaque PCR. |
| **Lyse** | Ajouter **50 µL de tampon LF3 et 2 µL de tampon L2*.**<br>Fermer et Homogénéiser.<br>Incuber **5 minutes +65 °C** puis **15 minutes +95 °C.**<br>Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs.<br>*Rem : ajouter **0,5 µL d'EPC-Ext/puits PCR** lors de l'étape d'amplification pour les kits concernés.* |

*Extemporanément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.
L'**EPC-Ext** est fourni dans le kit du pathogène d'intérêt.
*Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.*

## 2. Extraction à partir de carte FTA

| Echantillons | Mycoplasmes / Influenza Virus / Infectious Bronchitis Virus |
|---|---|
| **Lyse** | Couper un morceau de **3 mm²** de carte FTA<br>Le placer dans un microtube<br>Ajouter 100 µL de tampon LF1, vortexer 10 sec et éliminer le surnageant<br>Ajouter 100 µL de tampon LF3, vortexer 10 sec et éliminer le surnageant<br>Ajouter 100 µL de tampon LF3, vortexer 10 sec et incuber **5 minutes à +95 °C**<br>Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs |

## 3. Extraction à partir de fèces et de prélèvement environnementaux (raclage de bouse)

| Echantillon | *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* |
|---|---|
| **Préparation** | Prélever **1 cuillère** de matière fécale à l'aide du dispositif ADIAPREP.<br>Araser la cuillère et la réintroduire dans le dispositif.<br>Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène.<br>Transférer **1 mL** dans un microtube, une barrette ou une plaque 96 puits.<br>Centrifuger **5 minutes à 3 000 g** et éliminer le surnageant.<br>Ajouter au culot **300 mg** de billes de broyage et **500 µL** de **tampon LF1**.<br>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**.<br>Collecter **50 µL** de surnageant. |
| **Lyse** | Ajouter **50 µL de tampon LF3, 2 µL de L2 buffer et 5 µL of EPC-Ext***<br>Couvrir et homogénéiser.<br>Incuber **5 minutes à +65°C** puis **15 minutes à +95°C.**<br>Laisser refroidir les échantillons pour assurer l'exactitude des pipetages ultérieurs. |

* Extemporanément, un pré-mix contenant les 3 réactifs peut être réalisé puis distribué pour chaque échantillon.
L'**EPC-Ext** est fourni dans le kit du pathogène d'intérêt.
*Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.*

## 4. Amplification

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

# V. Index 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 |
| | Conserver à l'abri de la lumière |
| | Pour usage vétérinaire in vitro uniquement – Pour usage animal uniquement |