

## **Protocoles pour automates KingFisher**

### **Avec kit d'extraction**

#### **"ADIAMAG"**

**Réf. NADI003 (200 extractions)**

**Réf. NADI003-XL (800 extractions)**

# Protocoles pour automates KingFisher

## Avec kit d'extraction

### « ADIAMAG »

<b>PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE.....</b>	<b>3</b>
<b>I. INFORMATIONS GENERALES.....</b>	<b>4</b>
1. PRINCIPE DU KIT .....	4
2. DESCRIPTION DU TEST .....	5
<b>II. MATERIEL ET REACTIFS .....</b>	<b>7</b>
1. COMPOSITION DU KIT .....	7
2. VALIDITE ET CONSERVATION .....	7
3. MATERIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI DANS LE KIT.....	7
<b>III. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS.....</b>	<b>9</b>
1. PRECAUTIONS.....	9
2. CONSERVATION DES EXTRAITS D'ACIDES NUCLEIQUES.....	9
3. PREPARATION DES TEMOINS .....	9
<b>IV. PREPARATION DES TAMPONS ET CHARGEMENT DES AUTOMATES D'EXTRACTION.....</b>	<b>10</b>
1. PREPARATION DU TAMPON DE CAPTURE.....	10
2. CHARGEMENT DE L'AUTOMATE D'EXTRACTION.....	10
3. PROGRAMME DE L'AUTOMATE .....	11
<b>V. PREPARATION DES ECHANTILLONS AVANT TRANSFERT A L'AUTOMATE.....</b>	<b>12</b>
1. A PARTIR DE SANG/SERUM .....	12
2. A PARTIR DE FLUIDES ORAUX.....	12
3. A PARTIR DE LAIT .....	13
4. A PARTIR DE SURNAGEANT DE CULTURE.....	13
5. A PARTIR DE BIOPSIE AURICULAIRE SECHE ET HUMIDE (BAH).....	13
6. A PARTIR DE BIOPSIE AURICULAIRE LIQUIDE (BAL) .....	14
7. A PARTIR DE BIOPSIE CUTANEE (PEAU) .....	14
8. A PARTIR DE LAVAGE TRACHEO-BRONCHIQUE .....	14
9. A PARTIR D'EAU (ENVIRONNEMENT) ET D'URINE.....	15
10. A PARTIR DE LIQUIDE CÉLOMIQUE .....	15
11. A PARTIR DE JUS STOMACAL D'AVORTON.....	15
12. A PARTIR DE PLUME .....	16
13. A PARTIR DE CARTE FTA.....	16
14. A PARTIR DE TISSU OU D'ENCEPHALE .....	17
15. A PARTIR D'ECOUVILLON .....	19
16. A PARTIR DE FECES/FIENTE.....	21
17. A PARTIR DE PRELEVEMENT D'ENVIRONNEMENT (CHIFFONNETTE, PEDICHIFFONNETTE...).....	23
18. A PARTIR DE SPERME OU D'ŒUF DE POISSON .....	24
<b>VI. AMPLIFICATION.....</b>	<b>25</b>
<b>VII. INDEX DES SYMBOLES .....</b>	<b>26</b>

## Principales modifications par rapport à la version précédente

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
2022/01	NFKF-23	Administratif	Suppression Annexe I
2022/01	NFKF-23	Modification technique	Ajustement du protocole pour la recherche de <i>Besnoitia besnoiti</i> à partir de biopsie cutanée (peau). Ajout protocole pour la recherche de <i>Coxiella</i> , <i>Chlamydia</i> à partir jus stomacal d'avorton. Ajout protocoles pour la recherche du virus Marek. Ajout protocole pour la recherche Influenza aviaire à partir de plume et carte FTA. Ajout protocole pour la recherche de mycoplasmes aviaires à partir de carte FTA. Ajout protocoles pour la recherche de <i>Salmonella</i> à partir d'échantillons issus d'avortement et jus stomacal d'avorton. Ajout protocoles pour la recherche de Circovirus porcin (PCV2&PCV3).
2022/09	NFKF-24	Modification technique	Ajout protocoles pour la recherche de BVD à partir de biopsie auriculaire humide (BAH) et liquide (BAL).
2022/11	NFKF-25	Modification technique	Ajout protocole pour la recherche de <i>Mycobacterium avium</i> subsp <i>paratuberculosis</i> à partir de fèces et tissu. Ajout protocole pour la recherche du Virus Influenza et Virus SDRP à partir de lavage trachéo-bronchique. Ajout des prélèvements environnementaux pour la recherche du Virus de l'Influenza. Ajout protocoles pour la recherche du virus de la bronchite infectieuse.
2023/11	NFKF-26	Modification technique	Ajout des protocoles pour la recherche des virus de poisson IHNV, VHSV à partir de produits génitaux. Ajout des protocoles pour la recherche d'EHDV à partir de sang et de tissus. Ajout des protocoles pour la recherche de BTV à partir de tissus.

## I. Informations générales

---

### 1. Principe du kit

ADIAMAG est un kit d'extraction des acides nucléiques ADN/ARN basé sur l'adsorption des acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques. Le kit est adapté aux automates KingFisher™ mL, DUO et 96/Flex. Il contient l'ensemble des tampons nécessaires à l'extraction ADN/ARN à partir de différentes matrices.

**En cas d'utilisation d'un automate différent que ceux validés, merci de contacter support.pcr@bio.com**

Dans un premier temps, la lyse des échantillons est réalisée au dehors de l'automate à l'aide de tampons appropriés. Puis l'ensemble des surnageants, quels que soit la matrice et pathogène recherchés, peuvent être traités avec la même programmation d'automate KingFisher™ mL, DUO ou 96/Flex. Le tableau ci-après décrit le programme utilisé.

Etape	Description
1	Libération des acides nucléiques et fixation aux billes magnétiques. Capture des billes par les barreaux magnétiques et transfert en étape 2.
2	Libération des billes. Lavage dans le tampon W3. Capture des billes par les barreaux magnétiques et transfert en étape 3.
3	Libération des billes. Lavage dans le tampon W4. Capture des billes par les barreaux magnétiques et transfert en étape 4.
4	Libération des billes. Lavage en éthanol 80 %. Capture des billes par les barreaux magnétiques, séchage hors des puits et transfert en étape 5.
5	Elution des acides nucléiques dans le tampon E6. Capture des billes dépourvues d'acides nucléiques et transfert en étape 3.

**Nous contacter pour l'installation du programme pilotant l'automate.**

## 2. Description du test

Adiagène a validé les kits ADIAMAG à partir de diverses matrices pour la détection de différents pathogènes ADN/ARN de la gamme PCR ADIAVET™ et ADIALYO™. Les tableaux ci-après résument les protocoles validés.

		Prélèvements																	
		Sang EDTA	Sérum, plasma	Biopsie auriculaire	Biopsie cutanée	Tissus	Encéphale	Ecouvillon	Fluides oraux	Fèces/fiente	Lait	Lavage trachéo-bronchique	Surnageant de culture	Urine/Eau (environnement)	Semence	Plume	Carte FTA	Jus stomacal avorton	Prélèvement environnement
<b>Maladies multi-espèces</b>	Virus influenza					X		X	X	X		X	X			X	X		X
	<i>Chlamydia</i>					X		X			X							X	
<b>Maladies des ruminants</b>	BoHV-4							X											
	<i>Coxiella burnetii</i>					X		X		X	X							X	
	<i>Leptospira</i>					X		X					X						
	<i>Neospora caninum</i>					X	X	X											
	Virus BVD	X	X	X		X*					X								
	Virus de Schmallenberg (SBV)	X	X			X	X												
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	X				X		X											
	<i>Besnoitia besnoiti</i>	X			X														
	<i>Toxoplasma gondii</i>					X	X	X		X									
	Bluetongue virus (BTV)	X				X													
	Maladie hémorragique épizootique (EHDV)	X				X													
	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>					X				X									X
	<i>Salmonella</i>					X		X										X	
<b>Maladies porcines</b>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>					X		X	X			X							
	Virus PRV, Aujeszky's disease					X*	X	X				X							
	Virus SDRP	X	X			X		X	X			X							
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>					X		X											
	Virus de la peste porcine Classique (CSFV)	X	X			X*													
	Virus de la peste porcine Africaine (ASFV)	X	X			X*		X											
	Circovirus porcin (PCV2&PCV3)	X	X			X													

\*Si utilisation de la référence NADI003-XL, il est nécessaire d'ajouter la référence NADI004 en plus pour ces matrices. Se référer aux notices d'utilisation des kits PCR ADIAVET™ et ADIALYO™ pour la taille des analyses en mélange.

		Prélèvements																	
		Sang EDTA	Sérum, plasma	Biopsie auriculaire	Biopsie cutanée	Tissus	Encéphale	Ecouvillon	Fluides oraux	Fèces/fientes	Lait	Lavage trachéo-bronchique	Surnageant de culture	Urine/Eau (environnement)	Liquide coelomique, sperme, œuf	Plume	Carte FTA	Jus stomacal avorton	Prélèvement environnement
<b>Maladies aviaires</b>	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> <i>Mycoplasma synoviae</i> <i>Mycoplasma meleagridis</i> <i>Mycoplasma iowae</i>							X								X			
	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>							X											
	Virus Marek				X									X					X
	Virus bronchite infectieuse							X											X
<b>Mérite contagieuse équine (CEMO)</b>	<i>Taylorella equigenitalis</i> , <i>Taylorella asinigenitalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>							X											
<b>Maladies des poissons</b>	Nécrose hématopoïétique infectieuse (IHNV)				X							X		X					
	Septicémie hémorragique virale (VHSV)				X							X		X					
	Nécrose pancréatique infectieuse (IPNV)				X							X		X					
<b>Maladies félines</b>	Coronavirus Félin (PIF)	X						X											

## II. Matériel et réactifs

### 1. Composition du kit

Les kits « ADIAMAG » contiennent les réactifs suivants :

Désignations des composants	Type de composant	NADI003 ADIAMAG 200 extractions	NADI003-XL ADIAMAG XL 800 extractions	NADI004 LB3 -125 mL	Consignes
Lysis Buffer - LB1	Tampon de lyse 1	1 x 20 mL	1 x 100 mL		Prêt à l'emploi
Lysis Buffer - LB2	Tampon de lyse 2	1 x 50 mL	2 x 125 mL		Prêt à l'emploi
Lysis Buffer - LB3	Tampon de lyse 3	1 x 125 mL		1 x 125 mL	Prêt à l'emploi
ADIAMAG beads	Billes magnétiques	2 x 1,5 mL	1 x 12 mL		Prêt à l'emploi
Binding Buffer - B2	Tampon de Binding	1 x 180 mL	1 x 500 mL		Prêt à l'emploi
Wash Buffer - W3	Tampon de lavage	1 x 75 mL	1 x 300 mL		Prêt à l'emploi
Wash Buffer - W4	Tampon de lavage	1 x 75 mL	1 x 300 mL		Prêt à l'emploi
Elution Buffer - E6	Tampon d'éluion	1 x 30 mL	1 x 125 mL		Prêt à l'emploi
Proteinase K - PK	Enzyme	1 x 75 mg	4 x 75 mg		Lyophilisé – à remettre en suspension
Proteinase Buffer - BPK	Tampon de réhydratation	1 x 8 mL	1 x 15 mL		Prêt à l'emploi

### 2. Validité et conservation

A réception, tous les réactifs d'extraction se conservent à température ambiante (+18 à 25 °C) et sont stables jusqu'à 1 an après ouverture et au maximum jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit. Veiller à bien refermer les flacons pour éviter toute évaporation.

Avant la première utilisation, ajouter 2,6 mL de « Protéinase Buffer - BPK » au tube de « Protéinase K – PK » lyophilisée. La solution doit être stockée à une température inférieure à -15 °C entre chaque utilisation.

Le tampon de lyse Lysis buffer LB2 peut précipiter et doit, dans ce cas, être préchauffé à +70 °C avant utilisation.

Les tampons de lyse Lysis buffer LB1 et LB3 peuvent précipiter et doivent, dans ce cas, être préchauffés entre 30-40 °C avant utilisation.

### 3. Matériel nécessaire mais non fourni dans le kit

**Attention : le consommable utilisé doit être Nucléase-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.
- Centrifugeuse pour microtubes et tubes de 20 mL.
- Vibrobroyeur à billes (Mixer Mill ou Fast Prep).
- Etuve, bain-marie ou bloc chauffant.
- Vortex.
- Pipettes de 1 - 10 µL, 20 - 200 µL et 200 – 1 000 µL.
- Embouts Nucléase-free avec filtres pour micropipettes.
- Microtubes Nucléase-free de 1,5 mL et 2 mL.
- Tubes stériles de 10 ou 15 mL.
- Gants latex ou nitriles non poudrés.
- Lames de scalpel.
- Ethanol 80 %.
- Eau déminéralisée stérile.
- Eau physiologique stérile (NaCl 8,5g/L).
- Tampon PBS 1X (composition recommandée, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7mM, sans Ca<sup>2+</sup>, sans K<sup>+</sup> - une composition différente peut être utilisée après validation par l'utilisateur).
- Eau PPI.
- MEM medium + antibiotiques (pénicilline 100 IU/mL and streptomycine 100 µg/mL).

### **Consommables pour automates KingFisher**

#### **KingFisher 96/Flex:**

- Plaques DEEP WELL (Thermo scientific, 96 tests: réf. 10373480).
- Plaques ELUTION PLATES (Thermo scientific, 96 tests: réf. 10357939).
- Peigne TIPS (Thermo scientific, 96 tests: réf. 11744978).

#### **KingFisher DUO:**

- Plaques DEEP WELL (Thermo scientific, 96 tests: réf. 10373480).
- Peigne 12-TIPS (Thermo scientific, 600 tests: réf. :97003500).

#### **KingFisher ML:**

- KingFisher combi 240 (Thermo scientific, 240 tests: réf. :97002141).

### **Spécifique pour la recherche de *Mycobacterium avium* sbsp. *paratuberculosis***

- ADIAFILTER (Bio-X Diagnostics, 100 tests : réf. ADIFIL100).
- ADIAPREP (Bio-X Diagnostics, 100 tests : réf. ADPREP-200).
- Billes de broyage uniquement pour vibrobroyeur à billes Mixer Mill :
  - ADIAPURE™ ALIQUOTED GLASS BEADS (Bio-X Diagnostics, 480 tests: réf. ADIADPBIA-480).
  - ADIAPURE™ GLASS BEADS RACKS 4x96 (Bio-X Diagnostics, 384 tests: réf. ADPBIAR-4x96).
- Billes de broyage uniquement pour vibrobroyeur à billes Fast Prep ou similaire :
  - Tubes Lysing Matrix B (MP Biomedical, 100 extractions: réf. 116911.100).

### **Spécifique pour la recherche du SBV ou Influenza virus à partir de tissus :**

- Tubes Lysing Matrix D (MP Biomedical, 100 extractions : réf. 116913.100) uniquement pour vibrobroyeur à billes Fast Prep.
- Billes de tungstène ou inox 3 mm (par exemple, Qiagen, 200 extractions : réf. 69997) uniquement pour vibrobroyeur à billes Mixer Mill.

### 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

Les ADN extraits sont des molécules sensibles. Les extraits d'ADN peuvent être stockés dès la fin de l'extraction à +2/8 °C pendant 24 heures, puis doivent être conservés à <-15 °C.

Les ARN extraits sont des molécules sensibles. L'extraction est réalisée à température ambiante et doit donc être aussi rapide que possible pour éviter les dégradations. Il est conseillé de lire la totalité du protocole et bien préparer chaque manipulation avant de débiter l'extraction d'ARN. Les extraits d'ARN purifiés 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. Pour une conservation de longue durée, il est recommandé de conserver les acides nucléiques extraits à une température <-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 ADIAVET™ ou ADIALYO™ permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « positive control » inclus dans le kit de diagnostic ADIAVET™ ou 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<sub>METHODE</sub> (par exemple, entre 1 et 100 X LD<sub>METHODE</sub>). Il permet d'établir un suivi, sous forme de carte de contrôle, renseignant sur la fidélité des résultats obtenus.

## IV. Préparation des tampons et chargement des automates d'extraction

### 1. Préparation du tampon de capture

Il est conseillé de préparer le tampon de capture extemporanément juste avant de lancer le programme de l'automate. Bien mélanger la solution « ADIAMAG Beads » avant toute utilisation.

Pour les volumes à préparer, prévoir au moins une réaction en plus (volume mort de pipetage).

Mélanger (par échantillon) :

- 600 µL de **Binding buffer B2**.
- 13 µL de billes magnétiques **ADIAMAG Beads**.

### 2. Chargement de l'automate d'extraction

Selon l'automate utilisé, le chargement se fait de la manière suivante :

- KingFisher™ ML : une barrette de tubes par échantillon.
- KingFisher™ Duo : 1 plaque 96 Deep Well.
- KingFisher™ 96/flex : 5 plaques 96 Deep Well + 1 plaque 96 (réutilisable pour le peigne).

Répartissez les tampons dans chaque plaque/ligne/puits utilisé(e) comme décrit dans le tableau suivant :

	Réactifs à ajouter	KingFisher™ ML	KingFisher™ DUO	KingFisher™ 96/Flex
Préparation des réactifs	600 µL tampon de capture (600 µL Binding Buffer B2 + 13 µL ADIAMAG beads)	Puits 1 	Ligne B 	Plaque 1 
	350 µL Wash Buffer W3	Puits 2 	Ligne C 	Plaque 2 
	350 µL Wash Buffer W4	Puits 3 	Ligne D 	Plaque 3 
	350 µL Ethanol 80 %	Puits 4 	Ligne E 	Plaque 4 
	60 µL ou 100 µL* Elution Buffer E6	Puits 5 	Ligne F 	Plaque 5 
	Peigne	Sur rail 	Ligne A 	Plaque 6 
Chargement de l'échantillon et lancement de l'automate	Transférer le volume d'échantillon préparé selon §V, dans le Puits 1/Ligne B/Plaque 1. Allumer l'automate. Sélectionner le programme de l'automate. Placer les barrettes / plaques dans l'automate. Appuyer sur Start pour démarrer. En fin d'extraction, récupérer les acides nucléiques purifiés dans le Puits 5/Ligne F/Plaque 5.			

\*100 µL pour la recherche du Virus Influenza, virus PRV, virus Marek, Circovirus Porcin, *Besnoitia besnoiti*, *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (protocole ADIAPREP), *Salmonella* et les maladies des poissons.

### 3. Programme de l'automate

Les programmes des différents automates validés sont référencés dans le tableau ci-dessous :

	<b>Programme standard (34 minutes)</b>	<b>Programme court (21 minutes)</b>
<b>KingFisher™ 96/Flex</b>	KF96V3-2	KF96V4-2
<b>KingFisher™ Duo</b>	KFDUOV3-1	KFDUOV4-1
<b>KingFisher™ ML</b>	KFMLV3	KFMLV4

Les programmes ci-dessus, ainsi que des programmes d'autres automates, sont fournis sur demande ([support.pcr@biox.com](mailto:support.pcr@biox.com)).

*Attention, dans la mise en page des programmes, vous pouvez avoir une différence entre volume réel et volume programmé. Cette différence est validée.*

## V. Préparation des échantillons avant transfert à l'automate

### 1. A partir de sang/sérum



	Virus BVD, BTV, EHDV, SBV, SDRP, CSFV, PIF et ASFV	PCV2 et PCV3	<i>A. phagocytophilum</i> et <i>Besnoitia besnoiti</i>
Préparation échantillon	Prélever <b>100 µL</b> d'échantillon.	Prélever <b>100 µL</b> d'échantillon.	Placer <b>500 µL</b> à <b>1 mL</b> de sang de <b>bovin</b> ou <b>100 µL</b> de sang d' <b>équin</b> dans un microtube. Ajouter <b>1 mL</b> d' <b>eau PPI</b> . Homogénéiser et incubé 10 minutes sur glace. Centrifuger à 6 000 g/5 minutes. Éliminer le surnageant. Ajouter <b>1 mL</b> d' <b>eau PPI</b> . Centrifuger à 6 000 g/5 minutes. Éliminer le surnageant.
Lyse	Ajouter <b>250 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB2</b> <sup>2</sup> . Homogénéiser.	Ajouter <b>250 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB2 + 10 µL Protéinase PK</b> . <sup>1</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.	
Chargement de l'automate	Transférer <b>200 µL</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1). <sup>3</sup>		

<sup>1</sup>Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

<sup>3</sup>Dans le cas d'une lyse en plaque 96, il est possible d'ajouter directement le tampon de capture dans l'échantillon lysé.

### 2. A partir de fluides oraux

	<i>M. hyopneumoniae</i> , Virus SDRP et Virus Influenza
Préparation échantillon	Prélever <b>100 µL</b> d'échantillon.
Lyse	Ajouter <b>250 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB2</b> . <sup>1</sup> Homogénéiser.
Chargement de l'automate	Transférer <b>200 µL</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1). <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

<sup>2</sup>Dans le cas d'une lyse en plaque 96, il est possible d'ajouter directement le tampon de capture dans l'échantillon lysé.

### 3. A partir de lait

	<b>Virus BVD, <i>C. burnetii</i> et <i>Chlamydia</i></b>
<b>Préparation échantillon</b>	Prélever <b>100 µL</b> d'échantillon.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,2</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à +56 °C.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup>Extemporanément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

### 4. A partir de surnageant de culture

	<b>PRV, IHNV, VHSV, IPNV et Influenza</b>
<b>Préparation échantillon</b>	Prélever <b>100 µL</b> d'échantillon.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,2</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup>Extemporanément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

### 5. A partir de biopsie auriculaire sèche et humide (BAH)

	<b>Virus BVD</b>
<b>Préparation échantillon</b>	A partir d'une biopsie auriculaire sèche ou humide. <i>Dans le cas d'une boucle TST-L d'ALLFLEX, supprimer le liquide de conservation du tube collecteur.</i>
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>350 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB3</b> . <sup>1</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante. <sup>2</sup>
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>100 µL</b> de <b>surnageant</b> ou de <b>mélange</b> <sup>3</sup> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup> Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

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

<sup>3</sup> Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, **50 µL** de chaque solution obtenue individuellement.

## 6. A partir de biopsie auriculaire liquide (BAL)

Dans le cas d'une boucle TST-L d'ALLFLEX, éjecter la biopsie dans le tampon de conservation et ajuster, si nécessaire, le volume à 250 µL avec le tampon de conservation ALLFLEX puis d'incuber 1 heure à température ambiante. Pour l'extraction, utiliser le tampon comme matrice.

	<b>Virus BVD</b>
<b>Préparation échantillon</b>	Prélever <b>100 µL</b> de tampon ou mélange <sup>1</sup> de tampon de conservation issu de biopsie auriculaire.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1 + 10 µL</b> de <b>Protéinase PK.</b> <sup>2</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup> Possibilité de faire des pools, jusqu'à 25, en mélangeant, par exemple, **50 µL** de chaque solution obtenue individuellement.

<sup>2</sup> Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

## 7. A partir de biopsie cutanée (peau)

	<b>Besnoitia besnoiti</b>
<b>Préparation échantillon</b>	Placer <b>50 mg</b> de peau dans un microtube.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1 + 10 µL</b> de <b>Protéinase PK + 100 µL</b> de <b>tampon PBS 1X (ou eau physiologique).</b> <sup>1</sup> Homogénéiser. Incuber 1 nuit à +56 °C.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>20 µL</b> ou <b>la totalité</b> de <b>surnageant</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup> Extemporément, un pré-mix contenant les 3 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

## 8. A partir de lavage trachéo-bronchique

	<b>M. hyopneumoniae, Virus SDRP, Virus Influenza</b>
<b>Préparation échantillon</b>	Placer <b>1 mL</b> de lavage trachéo-bronchique dans un microtube. Centrifuger 30 minutes à 10 000 g. Éliminer le surnageant.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1 + 10 µL</b> de <b>Protéinase PK.</b> <sup>1,2</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup> Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup> Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

## 9. A partir d'eau (environnement) et d'urine

	<b><i>Leptospira</i></b>
<b>Préparation échantillon</b>	Placer <b>10 mL</b> dans un tube adapté. Centrifuger 30 minutes à 10 000 g ou 10 minutes à 4 500g. Éliminer le surnageant. Ajouter <b>1 mL</b> de PBS 1X. Homogénéiser.
<b>Lyse</b>	Transférer <b>100 µL</b> dans un microtube contenant <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à +56 °C.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup>Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

## 10. A partir de liquide célomique

	<b>IHNV, VHSV, IPNV</b>
<b>Préparation échantillon</b>	Prélever <b>100 µL</b> d'échantillon.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> + <b>5 µL</b> d' <b>EPC-Ext</b> . <sup>1</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup> Les EPC-Ext sont fournis dans le kit du pathogène d'intérêt. Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

Extemporément, un pré-mix contenant les 3 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

## 11. A partir de jus stomacal d'avorton

	<b><i>C. burnetii, Chlamydia, Salmonella</i></b>
<b>Préparation échantillon</b>	Placer <b>100 µL</b> d'échantillon (Si le liquide est difficile à prélever, plonger un écouvillon et traiter-le selon le protocole Ecouvillon §15. A. f).
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,2</sup> Homogénéiser.
	Incuber 15 minutes à +56 °C.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup>Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

## 12. A partir de plume

	Influenza aviaire et virus Marek
<b>Préparation échantillon</b>	Couper l'extrémité du calamus de 1 à 5 plumes précautionneusement pour éviter toutes projections et les placer dans 2 mL d'eau physiologique. Placer <b>100 µL</b> d'échantillon dans un microtube.
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1 + 10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,2</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup>Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

*Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.*

## 13. A partir de carte FTA

	Virus Influenza, Mycoplasmes aviaires
<b>Lyse</b>	Couper un morceau de 3 mm <sup>2</sup> de la carte FTA. Placer le morceau dans un microtube. Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1 + 10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,2</sup> Homogénéiser et incuber 15 minutes à température ambiante.
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>la totalité</b> de la suspension dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup>Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

*Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.*

## 14. A partir de tissu ou d'encéphale

### A. Préparation des échantillons

- a) **Virus BVDV, CSFV, ASFV (tissus lymphoïdes : rate, ganglions, amygdale), PRV (encéphale, poumon) avec le tampon LB3**

Placer **20 mg** d'échantillon dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.



- b) **Virus influenza, SBV (encéphale, rate), BTV, EHDV et virus Marek**

Broyer<sup>1</sup> ou <sup>2</sup> **0,1 g** d'échantillon avec **1 mL** de tampon (solution tamponnée phosphate (STP), MEM (ou similaire), PBS 1X ou similaire).

Transférer **100 µL** du surnageant de **broyat** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

Remarque Virus Influenza : pour les mélanges de 5 organes identiques de même espèce, même lieu géographique et même lieu de prélèvement, mélanger volume à volume chaque surnageant.

<sup>1</sup> Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Mixer Mill : ajouter une bille de tungstène (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz puis centrifuger 6 000 g/2 minutes.

<sup>2</sup> Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Fast Prep : dans un tube Lysing Matrix D, broyer 2 fois 20 secondes à 6m/sec avec une pause de 5 minutes sur glace entre les 2 broyages, puis centrifuger 2 000 g/3 minutes.

- c) **Virus IHNV, VHSV et IPNV (rate, rein antérieur et cœur ou encéphale)**

Homogénéiser, par stomacher, mélangeur ou mortier et pilon avec du sable stérile, re-suspendre dans le milieu de transport d'origine avec un ratio de 10 % poids/volume, centrifuger 15 minutes à 4 000 g.  
ou

Broyer<sup>1</sup> ou <sup>2</sup> **0,1 g** d'échantillon avec **1 mL** de tampon PBS 1X ou eau physiologique.

Transférer **100 µL** du surnageant de **broyat** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

<sup>1</sup> Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Mixer Mill : ajouter une bille de tungstène (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz puis centrifuger 6 000 g/2 minutes.

<sup>2</sup> Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Fast Prep : dans un tube Lysing Matrix D, broyer 2 fois 20 secondes à 6m/sec avec une pause de 5 minutes sur glace entre les 2 broyages, puis centrifuger 2 000 g/3 minutes.

- d) **M. hyopneumoniae, virus SDRP (poumon), ASFV (tissus lymphoïdes : rate, ganglions, amygdale), PCV2 et PCV3**

Placer **20 mg** d'échantillon dans un microtube.

NB : pour le virus SDRP, un pool de 3 tissus peut être réalisé en broyant 20 mg de chaque échantillon dans le même tube.

Ajouter **1 mL** d'eau physiologique.

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.

Transférer **100 µL** de surnageant de **broyat** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

- e) **Actinobacillus pleuropneumoniae**

Vortexer une biopsie dans **1 mL** d'eau physiologique.

Placer **20 µL** du liquide obtenu dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

- f) **A. phagocytophilum, C. burnetii, Chlamydia, Leptospira., N. caninum, T. gondii et Salmonella (tissus, par exemple cotylédon de placenta, tissus fœtaux)**

L'analyse à partir de rate n'est pas recommandée. La présence d'inhibiteur de la PCR peut interférer avec l'analyse.

Frotter l'intérieur du tissu avec un écouvillon sec.

Continuer en suivant le § 15.A.f.

**g) N. caninum et T. gondii (encéphale)**

Mélanger **1 volume d'encéphale** avec **1 volume d'eau physiologique**.  
Vortexer.  
Transférer **100 µL** du **mélange** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

**a) M. avium subsp. paratuberculosis**

Placer **20 mg d'échantillon** dans un microtube.  
Ajouter **1 mL d'eau physiologique**.  
Broyer (par exemple, à l'aide d'un Mixer Mill) 10 minutes à 30 Hz avec 1 bille de métal (3 mm) et 300 mg de billes (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBA1-480 or réf. ADPBIAR-4x96).  
Centrifuger 3 000 g/5 minutes.  
Transférer **100 µL** de surnageant de **broyat** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

**B. Extraction et purification des acides nucléiques**



	Virus BVDV	Virus PRV, CSFV et ASFV	<i>M. hyopneumoniae</i> , virus SBV, BTV, EHDV, SDRP, influenza, Marek, IHNV, VHSV, IPNV, ASFV, PCV2 et PCV3	<i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>N. caninum</i> et <i>T. gondii</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i>
<b>Lyse</b>	Ajouter <b>350 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB3</b> <sup>4</sup> . Homogénéiser.		Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,4</sup> Homogénéiser.		
	Incuber 15 minutes à température ambiante.	Broyer <sup>2-3</sup> .	Incuber 15 minutes à température ambiante.	Incuber 15 minutes à +56 °C.	Pas d'incubation
<b>Chargement de l'automate</b>	Transférer <b>100 µL</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).		Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).		

<sup>1</sup>Extemporanément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup> Par exemple avec un vibrobroyeur à billes type Mixer Mill : ajouter une bille de métal (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz puis centrifuger 6 000 g/2 minutes.

<sup>3</sup> Par exemple avec un vibrobroyeur à billes type Fast Prep : dans un tube *Lysing Matrix D*, broyer 2 fois 20 secondes à 6m/sec avec une pause de 5 minutes sur glace entre les 2 broyages, puis centrifuger 2 000 g/3 minutes.

<sup>4</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

## 15. A partir d'écouvillon

### A. Préparation des échantillons

#### a) *M. hyopneumoniae*, virus SDRP et virus PRV

Ajouter **2 mL d'eau physiologique** directement dans le tube de transport de l'écouvillon.  
Vortexer.

*NB : pour le virus SDRP, possibilité de faire un pool (3 maximum), transférer le surnageant obtenu dans le tube de transport de l'écouvillon suivant.*

Essorer chaque écouvillon pour récupérer le maximum de liquide.  
Transférer le liquide obtenu dans un microtube de 2 mL.  
Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### b) PIF

Ajouter **2 mL d'eau physiologique** directement dans le tube de transport de l'écouvillon.  
Vortexer.  
Essorer chaque écouvillon pour récupérer le maximum de liquide.  
Transférer le liquide obtenu dans un microtube de 2 mL.  
Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### c) Virus influenza aviaire

Cas d'analyses officielles ou d'autocontrôle :

Mettre 1 écouvillon dans **1 mL de milieu MEM (+/-antibiotiques)** ou de solution tamponnée phosphate (STP). Vortexer.

*Pour les mélanges de 5 écouvillons (selon le type de prélèvement, et sauf indication différente selon l'espèce d'oiseau, le lieu géographique, la date de prélèvement), mélanger volume à volume chaque surnageant.*

Placer **100 µL de liquide obtenu** ou de mélange dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

Cas étude de recherche ou étude épidémiologique :

Couper 1 à 5 écouvillons dans un tube adapté.

Ajouter **2 mL de milieu MEM (+/-antibiotiques)** ou d'**eau physiologique**.

Vortexer.

Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### d) Virus influenza porcine

Mettre 1 écouvillon dans **2 mL de milieu MEM + antibiotique** (en vue d'un éventuel isolement viral ultérieur) ou d'**eau physiologique** directement dans un tube.

Vortexer.

Prélever **100 µL de liquide obtenu**.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### e) *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Vortexer un écouvillon dans **1 mL d'eau physiologique**.

Placer **20 µL de liquide obtenu** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### f) *A. phagocytophilum*, *C. burnetii*, *Chlamydia*, *Leptospira.*, *N. caninum*, *T. gondii*, BoHV-4, ASFV et Salmonella.

Vortexer un écouvillon dans **1 mL de tampon PBS 1X**.

Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### g) *Mycoplasmes aviaires*, *Ornithobacterium rhinotracheale* et Bronchite infectieuse

Couper 1 à 3 écouvillons dans **1 mL d'eau physiologique**.

Placer **100 µL** de **liquide obtenu** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

- h) **CEMO : Taylorella equigenitalis, Taylorella asinigenitalis, Klebsiella pneumoniae et Pseudomonas aeruginosa**  
Vortexer un écouvillon dans **500 µL** de **tampon PBS 1X**.  
Placer **100 µL** de **liquide obtenu** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

## B. Extraction et purification des acides nucléiques

	<i>M. hyopneumoniae</i> , PIF, Virus SDRP, Virus PRV et Virus influenza, Bronchite infectieuse	<i>A. pleuropneumoniae</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>C. burnetii</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Leptospira.</i> , <i>N. caninum</i> , <i>T. gondii</i> , BoHV-4, <i>Salmonella</i> , mycoplasmes aviaires, <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> , CEMO et ASFV
Lyse	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Protéinase PK</b> . <sup>1,2</sup> Homogénéiser.	
	Incuber 15 minutes à température ambiante.	Incuber 15 minutes à +56 °C.
Chargement de l'automate	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).	

<sup>1</sup>Extemporément, un pré-mix contenant les 2 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup>Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

## 16. A partir de fèces/fiente

### A. Préparation des échantillons

#### a) *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

*Remarque : Une réhydratation toute la nuit à température ambiante peut être conseillée pour des fèces caprines et ovines.*

Trois protocoles ADIAMAG sont applicables :

- Avec ADIAPREP (réf. ADPREP-200)

Prélever 1 cuillère de matière fécale à l'aide du dispositif ADIAPREP.

Asérer la cuillère et la réintroduire dans le dispositif.

Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène.

Transférer 1 mL dans un microtube ou une plaque 96 puits.

Centrifuger 5 minutes à 3 000 g et éliminer le surnageant à la pipette.

Ajouter au culot 300 mg de billes de broyage (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBA1-480 or réf. ADPBIAR-4x96) et 500 µL d'eau déminéralisée stérile.

Broyer 5 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 secondes à 4m/sec sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 3 000 g.

Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

- Avec ADIAFILTER (réf. ADIFIL100)

Prélever 3 g (+/- 0,2) de fèces (ou ratio identique Poids/volume), homogénéiser dans 20 mL d'eau déminéralisée stérile. Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène. et laisser sédimenter 10 à 20 minutes.

Déposer 10 mL de surnageant dans l'ADIAFILTER, centrifuger 5 minutes à 3 000 g et éliminer le surnageant et le filtre ADIAFILTER.

Ajouter au culot 500 µL d'eau déminéralisée stérile, vortexer et transvaser dans un microtube contenant 300 mg de billes de broyage (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBA1-480 or réf. ADPBIAR-4x96).

Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 sec à 4m/sec sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes à 15 000 g.

Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

- Sans système de filtration de prélèvement

Prélever 3 g (+/- 0,2 g) de fèces (ou ratio identique Poids/volume), homogénéiser dans 20 mL d'eau déminéralisée stérile. Vortexer jusqu'à obtention d'une suspension homogène. et laisser sédimenter 10 à 20 minutes.

Transférer 1 mL dans un microtube contenant 300 mg de billes de broyage (Bio-X Diagnostics, réf. ADIADPBA1-480 or réf. ADPBIAR-4x96).

Broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill ou 3 x 45 sec à 4m/sec sur Fast Prep/Ribolyser puis centrifuger 5 minutes 15 000 g.

Placer **100 µL de liquide obtenu** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### b) *C. burnetii*

Peser **1 g de fèces**.

Ajouter **5 mL de tampon PBS 1X**.

Homogénéiser au moins 15 secondes.

Centrifuger à 3 000 g 2 minutes.

Transférer de **100 µL du surnageant** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

c) **T. gondii**

Peser **1 g de fèces** et le mettre dans un tube stérile de 10 ou 15 mL préalablement identifié.  
Ajouter **10 mL de tampon PBS 1X** (*cette préparation est stable 24 heures à température ambiante*).  
Homogénéiser environ 30 secondes.  
Laisser sédimenter 2 à 5 minutes.  
Prélever **500 µL de surnageant** et les placer dans un microtube préalablement identifié.  
Centrifuger 5 minutes à 3 000 g. Jeter le surnageant.  
Homogénéiser le culot avec **1 mL de tampon PBS 1X** (*cette solution est stable 24 heures à température ambiante*).  
Transférer **500 µL de surnageant** dans un tube contenant 300 mg de billes de broyage et broyer 10 minutes à 30 Hz sur Mixer Mill (ou transférer la solution obtenue dans un microtube Matrix B et broyer 3 x 45 secondes à 4 m/sec avec le Fast Prep).  
Centrifuger 5 minutes à 15 000 g.  
Transférer **100 µL de surnageant** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

d) **Virus Influenza aviaire**

Peser 1 g de fientes et ajouter 5 mL eau physiologique.  
Vortexer et sédimenter 5 min à température ambiante.  
Transférer **100 µL du surnageant** dans un microtube.

**B. Extraction et purification des acides nucléiques**

	<i>M. avium</i> subsp. <i>Paratuberculosis</i> (avec ADIAPREP) <sup>2</sup>	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (avec ADIAFILTER) <i>C. burnetii</i> , <i>T. gondii</i>	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (sans système de filtration), Virus de l'influenza aviaire
Lyse	Ajouter <b>100 µL de Lysis Buffer LB1 + 10 µL de Proteinase PK + 5 µL d'EPC-Ext.</b> <sup>1</sup> Vortexer.		
	Pas d'incubation	Incuber 15 minutes à <b>+56 °C</b>	Incuber 15 minutes à <b>température ambiante.</b>
Chargement de l'automate	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).		

<sup>1</sup> Les EPC-Ext sont fournis dans le kit du pathogène d'intérêt. Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

Extemporaneément, un pré-mix contenant les 3 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

<sup>2</sup> Utiliser 100 µL de tampon E6 (Puits 5/Ligne F/Plaque 5).

## 17. A partir de prélèvement d'environnement (chiffonnette, pédichiffonnette...)

### A. Préparation des échantillons

#### a) *M. avium* subsp. *paratuberculosis*

Les échantillons environnementaux (raclage de bouses, aire d'attente...) sont traités comme des fèces.  
Continuer au § 16.A.a).

#### b) Virus influenza aviaire

Malaxer la chiffonnette dans un volume maximal de 40 mL de tampon STP, 70 mL pour une pédichiffonnette.

Après homogénéisation, une étape de clarification par centrifugation est nécessaire selon les recommandations §8 de la norme NF U 47-210 : il est recommandé de centrifuger le maximum de volume entre 8 000 m.s<sup>-2</sup> et 12 000 m.s<sup>-2</sup> pendant 10 min à 15 min, à une température réglée entre 2 °C et 8 °C.

Transférer **100 µL de surnageant** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### c) Virus Marek, Bronchite Infectieuse et virus influenza porcine

Malaxer la chiffonnette dans 40 à 70 mL d'eau physiologique.

Centrifuger 1 mL de suspension à 1000 g pendant 10 minutes.

Transférer **100 µL de surnageant** dans un microtube.

Continuer en suivant le tableau ci-après.

### B. Extraction et purification des acides nucléiques

	<i>Virus Influenza</i> <i>Virus Bronchite infectieuse</i>	Virus Marek
Lyse	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1</b> + <b>10 µL</b> de <b>Proteinase PK</b> . <sup>1</sup>	
	Vortexer.	
	Incuber 15 minutes à <b>température ambiante</b> .	Incuber 15 minutes à <b>+56 °C</b> .
Chargement de l'automate	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).	

<sup>1</sup> Ajouter **5 µL** d'**EPC-Ext** fournis dans le kit du pathogène d'intérêt.

Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

Extemporément, un pré-mix contenant les 3 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

## 18. A partir de sperme ou d'œuf de poisson

### A. Préparation des échantillons

#### a) Virus IHNV, VHSV, IPNV (sperme frais (liquide))

Mélanger un volume de sperme avec 1 volume de PBS 1X  
Vortexer 20 secondes  
Centrifuger 2 minutes à 6000g.  
Transférer **100 µL** de surnageant dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

#### b) Virus IHNV, VHSV et IPNV (sperme coagulé, oeuf)

Homogénéiser, par stomacher, mélangeur ou mortier et pilon avec du sable stérile, re-suspendre dans le milieu de transport d'origine avec un ratio de 10 % poids/volume, centrifuger 15 minutes à 4 000 g.  
ou  
Broyer<sup>1 ou 2</sup> **0,1 g d'échantillon** avec **1 mL de tampon PBS 1X ou eau physiologique**.  
Transférer **100 µL** du surnageant de **broyat** dans un microtube.  
Continuer en suivant le tableau ci-après.

<sup>1</sup> Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Mixer Mill : ajouter une bille de tungstène (3 mm), broyer 2 minutes à 30 Hz puis centrifuger 6 000 g/2 minutes.

<sup>2</sup> Par exemple : avec un vibrobroyeur à billes type Fast Prep : dans un tube Lysing Matrix D, broyer 2 fois 20 secondes à 6m/sec avec une pause de 5 minutes sur glace entre les 2 broyages, puis centrifuger 2 000 g/3 minutes.

### B. Extraction et purification des acides nucléiques

	IHNV, VHSV, IPNV
Lyse	Ajouter <b>100 µL</b> de <b>Lysis Buffer LB1 + 10 µL</b> de <b>Protéinase PK + 5 µL</b> d' <b>EPC-Ext</b> . <sup>1</sup> Homogénéiser. Incuber 15 minutes à température ambiante.
Chargement de l'automate	Transférer <b>la totalité</b> dans le <b>tampon de capture</b> (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

<sup>1</sup> Les EPC-Ext sont fournis dans le kit du pathogène d'intérêt. Se reporter à la notice correspondante pour la préparation, la conservation et l'utilisation du contrôle.

Extemporaneément, un pré-mix contenant les 3 réactifs peut être réalisé puis être distribué pour chaque échantillon.

## VI. Amplification

---

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



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

RCS 417 876 299  
Tél. 33 (0)2 96 68 40 20  
[www.biox.com](http://www.biox.com)