

Protocoles pour automates KingFisher
Avec kit d'extraction
"ADIAMAG-NV"
réf. NADI003-NV

Protocoles pour automates KingFisher

Avec kit d'extraction

« ADIAMAG-NV »

PRINCIPALES MODIFICATIONS PAR RAPPORT A LA VERSION PRECEDENTE	3
I. INFORMATIONS GENERALES	4
1. Principe du kit	4
2. Description du test	4
II. MATERIEL ET REACTIFS	5
1. Composition du kit	5
2. Validité et conservation	5
3. Consommables pour automates KingFisher	5
A. KingFisher 96/Flex	5
B. KingFisher DUO	5
C. KingFisher ML	5
4. Matériel nécessaire mais non fourni	6
III. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS ET DES TEMOINS	7
1. Précautions	7
2. Conservation des extraits d'acides nucléiques	7
3. Préparation des témoins	7
A. Témoin négatif d'extraction (obligatoire)	7
B. Témoin positif « cible » d'extraction (recommandé)	7
IV. PREPARATION DES TAMPONS ET CHARGEMENT DES AUTOMATES D'EXTRACTION	8
1. Préparation du tampon de capture	8
2. Chargement de l'automate d'extraction	8
3. Programme de l'automate	9
V. PREPARATION DES ECHANTILLONS AVANT TRANSFERT A L'AUTOMATE	10
1. A partir d'écouvillon	10
A. Préparation des échantillons	10
B. Extraction et purification des acides nucléiques	10
VI. AMPLIFICATION	11
VII. INDEX DES SYMBOLES	12

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
2020/11	NFKF-NV01	Administratif	Première publication
2021/03	NFKF-NV02	Modificarion technique	Ajout extraction sur salive

I. Informations générales

1. Principe du kit

ADIAMAG-NV 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.

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 2

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

2. Description du test

Adiagène a validé le kit ADIAMAG-NV à partir d'écouvillon sec ou humide (type « virocult ») et de salive pour la recherche du SARS CoV-2.

Types de prélèvements et options d'analyse correspondantes :

Prélèvement *	Analyse individuelle
Écouvillon nasopharyngé, oropharyngé	<input checked="" type="checkbox"/>
Expectoration, crachat, salive, lavage bronchoalvéolaire, aspiration trachéobronchite	<input checked="" type="checkbox"/>

* réalisé par un professionnel de la santé et conservé selon les recommandations de la HAS

II. Matériel et réactifs

1. Composition du kit

Le kit ADIAMAG-NV contient les réactifs suivants :

REF NADI003-NV – 200 extractions		
Lysis Buffer – LB1	tampon de lyse 1	1 x 20 ml (prêt à l'emploi)
Lysis Buffer – LB2	tampon de lyse 2	1 x 50 ml (prêt à l'emploi)
Lysis Buffer – LB3	tampon de lyse 3	1 x 125 ml (prêt à l'emploi)
ADIAMAG beads.....	Billes magnétiques	2 x 1,5 ml (prêt à l'emploi)
Binding Buffer B2.....	Tampon de binding	1 x 180 ml (prêt à l'emploi)
Wash Buffer W3.....	Tampon de lavage	1 x 75 ml (prêt à l'emploi)
Wash Buffer W4.....	Tampon de lavage	1 x 75 ml (prêt à l'emploi)
Elution Buffer E6.....	Tampon d'éluion	1 x 30 ml (prêt à l'emploi)
Proteinase K - PK	Enzyme	1 x 75 mg (Lyophilisé – à remettre en suspension)
Proteinase Buffer - BPK	tampon de réhydratation	1 x 8 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 pendant 1 an. 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 » lyophilisé. 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. Consommables pour automates KingFisher

A. KingFisher 96/Flex

- Plaques DEEP WELL (Bio-X Diagnostics, 96 tests : réf. N10373480)
- Plaques ELUTION PLATES (Bio-X Diagnostics, 96 tests : réf. N10357939)
- Peigne TIPS (Bio-X Diagnostics, 96 tests : réf. N11744978)

B. KingFisher DUO

- Plaques DEEP WELL (Bio-X Diagnostics, 96 tests : réf. N10373480)
- Peigne 12-TIPS (Thermo scientific, 600 tests : réf :97003500)

C. KingFisher ML

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

4. Matériel nécessaire mais non fourni

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
- Vortex
- Pipettes de 1 - 10 μ l, 20 - 200 μ l et 200 - 1000 μ l
- Embouts Nuclease-free avec filtres pour micropipettes
- Microtubes Nuclease-free de 1,5 ml et 2 ml
- Tubes stériles de 5 ml
- Gants latex ou nitriles non poudrés
- Ethanol 80%
- Tampon PBS 1X pH=7.4 (composition recommandée, NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 5 mM, KH₂PO₄ 1,7mM, sans Ca²⁺, sans Mg²⁺ - une composition différente peut être utilisée après validation par l'utilisateur)

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 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. Concernant la recherche de H5-H7, IHNV et VHSV, il est recommandé de conserver les ARN 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.

Par exemple pour le test SARS CoV-2 :

- Le contrôle interne endogène permet de vérifier l'extraction et l'amplification de chaque échantillon.
- Le témoin « positive control » inclus dans le kit SARS-CoV-2 REAL TIME 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. 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) :

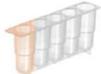
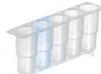
- 600 µl de **Binding buffer B2**
- 13 µl de billes magnétiques **ADIAMAG Beads**

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 (600µl 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 
	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.			

3. Programme de l'automate

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

	Programme court (21 minutes)
KingFisher™ 96/Flex	KF96V4-2
KingFisher™ Duo	KFDOV4-1
KingFisher™ mL	KFMLV4

Les programmes sont fournis sur demande (*biox@biox.com*)

V. Préparation des échantillons avant transfert à l'automate

1. A partir d'écouvillon

A. Préparation des échantillons

- **Ecouvillon type « virocult »**

Vortexer l'écouvillon dans liquide type « virocult ».
Placer **100 µl** de **liquide** dans un microtube ou plaque.
Continuer en suivant le tableau ci-après.

- **Ecouvillon sec**

Ajouter 1 ml de PBS 1X dans le tube de 5 ml
Vortexer l'écouvillon dans le tube.
Placer **100 µl** de **liquide** dans un microtube.
Continuer en suivant le tableau ci-après.

- **Salive**

Si la salive n'est pas conservée dans un tampon, ajouter 1/3 à 1/5 de PBS 1X au prélèvement (par exemple, ajouter 1 ml de PBS 1X à 250 µl de salive)

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

B. Extraction et purification des acides nucléiques

	SARS CoV-2
Lyse	Ajouter 100 µl de Lysis Buffer LB1 + 10 µl de Protéinase PK. ¹⁻² Homogénéiser.
	Incuber 15 minutes à température ambiante.
Chargement de l'automate	Transférer la totalité dans le tampon de capture (Puits 1/Ligne B/Plaque 1).

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

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

VI. Amplification

Pour l'amplification des acides nucléiques extraits, se reporter aux paragraphes « Protocole d'amplification » et « Lecture et interprétation des résultats » du manuel d'instruction kit SARS-CoV-2 REAL TIME PCR (réf. ADI621).

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

Bio-X Diagnostics, les logos, ADIAGENE 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**
9 rue Gabriel Calloët-Kerbrat
22440 Ploufragan - France

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