

Description de produit

Tampon de Lyse Flash sans purification des acides nucléiques Tissue Lysis Flash (TLF)

Cat N° TLF10ml

Cat N° TLF50ml

Cat N° TLF100ml

Solution de lyse rapide pour l'extraction sans purification d'acides nucléiques totaux Pour la recherche des pestivirus de ruminants avec le Bio-T kit® BVDV/BDV Universal

Types d'échantillons

- Biopsies auriculaire individuelle ou en mélange jusqu'à 10
- Sérums individuels

Principe

- Lyse Flash de 5 minutes à 95°C ± 1.5 avec tampon TLF
- Le lysat obtenu est directement utilisable pour la RT-PCR
- Protocole adapté validé uniquement pour la mise en œuvre du Bio-T kit® BVDV/BDV Universal sur biopsies auriculaires et sur sérums

Réservé à l'usage vétérinaire et pour le diagnostic *in vitro*



GESTION DES DOCUMENTS

Le Bio-T kit® BVDV/BDV Universal dispose de manuels techniques propres détaillant pour chaque type de prélèvement les méthodes d'extractions validées par BioSella et les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR. Les dernières versions en vigueur de ces documents figurent dans le certificat d'analyse (CA) fourni avec le Bio-T kit®.

En plus de ces manuels, le manuel général d'utilisation du Tampon de Lyse Flash décrit la composition du produit, les étapes préliminaires de reconstitution de certains réactifs ainsi que le principe général et commun d'utilisation du kit.

GESTION DES REVISIONS

BioSella indique les modifications apportées à ce document en les surlignant selon les règles présentées dans le tableau ci-dessous :

Gestion des révisions			
Type de modification Couleur de Surlignage	Modifications mineures	Modifications majeures 1	Modifications majeures 2
Impact sur la révision/version	Changement de la date de révision du document Pas de changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version	Changement de la date de révision du document + changement de version
Impact sur l'adoption de la méthode autorisée	Aucun (sauf en cas d'adoption de nouvelle matrice)	Aucun	Nouvelle adoption nécessaire
Exemples de modifications	Corrections : typographique, grammaticale ou de mise en forme	Changement de référence d'un EPC	Modification de la recette du Master Mix
	Ajout de nouvelles matrices pour l'extraction	Changement de référence d'un IPC exogène	Modification du protocole d'extraction validé
	Ajout d'informations donnant plus de détails ou alternative à un protocole		
	Ajout/Suppression d'informations optionnelles		

PRESENTATION

Description du tampon TLF

Le tampon TLF est une solution de lyse permettant une préparation ultra-rapide des échantillons sans purification des acides nucléiques.

Le protocole adapté et validé par BioSella (optimisation du volume de réactif et de la durée) est réservé à la détection du virus BVDV/BDV à partir de biopsies auriculaires (individuelles ou en mélange jusqu'à 10) et à partir de sérums (individuels) à l'aide du Bio-T kit® BVDV/BDV Universal.

Un pack de TLF10ml permet de réaliser 100 lyses flash individuelles (1 tube de 10 ml de TLF), un pack de TLF50ml permet de réaliser 500 lyses flash individuelles (5 tubes de 10 ml de TLF) et un pack de TLF100ml permet de réaliser 1000 lyses flash individuelles (1 bouteille de 100 ml de TLF). **ATTENTION, la décongélation du conditionnement TLF100ml prend environ 4 heures à température ambiante.** Il est recommandé d'aliquoter le TLF de manière à ce qu'un aliquot soit suffisant pour une série d'extraction. A réception du pack de TLF congelé, le conserver à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. **Lors de son utilisation, décongeler le TLF extemporanément et le conserver à $5^{\circ}\text{C} \pm 3$. En effet, la conservation du TLF à température ambiante peut altérer les performances de celui-ci. Aussi, il est très important de réduire au maximum la durée de conservation dans ces conditions afin de garantir des performances optimales. Après utilisation, recongeler à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ les reliquats de TLF. Il est recommandé de ne pas réaliser plus de 3 cycles de décongélation-congélation d'un tube.**

Liste des consommables, réactifs et matériels non fournis

Pour la matrice sérum, il est impératif d'utiliser l'IC exogène (ICBVDU-A tube à bouchon violet), fourni dans le Bio-T kit® BVDV/BDV Universel. Il doit être utilisé lors de l'extraction pour chacun des échantillons et des contrôles d'extraction (NCS, sentinelle ou MRI). BioSella recommande également de l'utiliser pour les biopsies auriculaires afin de valider l'extraction et l'absence d'inhibiteurs de la PCR.

Tableau 1. Consommables et réactifs non fournis			
Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
TLF Buffer	Flash Lysis Buffer	1 tube of 10 ml	TLF10ml
		5 tubes of 10 ml	TLF50ml
		1 bottle of 100ml	TLF100ml
Film adhésif métallique	96-well Plate Foil Seal	Agilent Technologies	5067-5154
Tampon PBS [¥]	Tampon phosphate salin	Fournisseur de votre choix [¥]	
Bloc thermique Lyse Flash Biopsie auriculaire	Bloc thermique adapté aux tubes Allflex	BioSella	BTLF
Bloc thermique Lyse Flash Sérum	Bloc thermique adapté aux plaques 96 puits	Fournisseur de votre choix	
Bio-T kit® BVDV/BDV Universel	Détection de BVDV/BDV et d'un contrôle positif interne endogène (IPC) et exogène (IC)	100 réactions	BIOTK042
		400 réactions	BIOTK090

Pour les consommables liés au thermocycleur, se reporter au manuel d'utilisation de l'appareil.

¥ L'utilisation d'un PBS 1X de qualité biologie moléculaire est très importante afin d'obtenir des résultats optimaux avec les protocoles d'extraction validés par BioSella (Lyse Flash sans purification, BioExtract® Superball® et BioExtract® Column). Ainsi, BioSella recommande d'utiliser un PBS commercial de qualité Biologie Moléculaire.

Principales précautions

- Travailler dans des zones dédiées et séparées afin d'éviter toute contamination : « Extraction » (stockage des échantillons non extraits, zone avec matériel d'extraction), « MIX » (stockage des MM prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des acides nucléiques extraits et des contrôles dans la plaque qPCR), « PCR » (zone finale, contenant le(s) thermocycleur(s)).
- Utiliser des équipements dédiés pour chaque zone de travail (gants, blouse, pipettes, vortex ...).
- Décongeler tous les réactifs stockés à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs juste avant utilisation.
- Utiliser des pointes à filtre.
- Il est recommandé de ne pas excéder 3 cycles de congélation-décongélation des réactifs, des échantillons, des lysats, et des acides nucléiques extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.
- Les génomes des pathogènes détectés par les kits de la **gamme RUMINANTS** sont à ADN ou à ARN. **Travailler avec de l'ARN étant plus exigeant que de travailler avec de l'ADN** (instabilité de l'ARN et omniprésence des RNases), **il est recommandé d'appliquer par défaut les précautions liées à l'utilisation de l'ARN** :
 - o Toujours porter des gants et les changer fréquemment notamment après tout contact avec la peau, les paillasses ou le matériel.
 - o Traiter toutes les surfaces et les équipements avec des agents d'inactivation des RNases (disponibles dans le commerce).
 - o Après avoir mis des gants et décontaminé le matériel, minimiser les contacts avec les surfaces et les équipements pour éviter la réintroduction des RNases.
 - o Utiliser des consommables « RNases free ».
 - o Il est recommandé de conserver les ARN réfrigérés pendant la manipulation puis de les congeler dès que possible de préférence à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ ou à défaut à $\leq -16^{\circ}\text{C}$.
 - o Ouvrir et refermer individuellement les tubes au fur et à mesure et limiter les durées d'ouverture afin d'éviter le contact avec les RNases présentes dans l'environnement (peau, poussières, surfaces de travail...).

A ces précautions générales s'ajoutent, **sur organes d'avortons, des précautions liées au risque zoonotique** en raison de la présence éventuelle de *Coxiella burnetii*, *Listeria*, *Leptospira*, *Salmonella*...

- A réception des prélèvements, **désinfecter l'extérieur des contenants à l'aide d'un sporicide avant de stocker et/ou de manipuler sous le PSM**.
- Lors de l'extraction, **il est obligatoire de travailler sous PSM jusqu'à la fin de l'étape de lyse des échantillons, en raison du risque zoonotique associé aux types d'échantillons manipulés**.
- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (à minima : blouse, gants jetables, voire lunettes de protection, masque FFP3 selon les risques zoonotiques...).

METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES (AN) VALIDEES

GENERALITES

La caractérisation de la méthode complète associant l'extraction pour les matrices de type biopsies auriculaires et sérum avec le kit de qRT-PCR (Bio-T kit® BVDV/BDV Universal) a été réalisée et validée suivant les prescriptions de la **norme NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR et les spécifications du Laboratoire Expert BVD (LE) de l'Anses-Niort.**

Recommandations pour le prélèvement, l'envoi et la conservation des échantillons

La technique de qRT-PCR en temps réel permet de révéler la présence de très faibles quantités de génome du pathogène. Celui-ci peut être plus ou moins rapidement dégradé selon la nature du pathogène (bactéries, parasites, virus enveloppés ou non...), la nature de son génome (ADN/ARN) et le type de prélèvement (présence de DNase/RNase). Ainsi, BioSellal recommande de suivre les préconisations suivantes pour garantir un diagnostic optimal.

Prélèvements

- Biopsies auriculaire individuelle ou en mélange jusqu'à 10
- Sérums individuels

Afin de prévenir les contaminations croisées entre échantillons pouvant conduire à un résultat faussement positif, il est important d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique et d'éviter un contact direct entre chaque prélèvement.

Envoi

Il est préférable d'effectuer l'envoi dans les 7 jours qui suivent le prélèvement et de conserver au froid positif avant envoi les biopsies auriculaires.

Conservation après réception

Traitement des échantillons pour analyse, immédiatement après réception ou congélation à $\leq -16^{\circ}\text{C}$ pour quelques mois et à $\leq -65^{\circ}\text{C}$ au-delà de 1 an.

PROTOCOLE D'EXTRACTION EN LYSÉ FLASH

Concernant les protocoles détaillés de Lyse Flash à partir de biopsies auriculaires se référer au manuel d'extraction du Bio-T kit® BVDV/BDV Universal. Les différentes étapes de préparation de la qRT-PCR sont détaillées dans le manuel d'utilisation du Bio-T kit® BVDV/BDV Universal.

Note : BioSellal recommande d'utiliser les acides nucléiques obtenus après lyse flash dans les 30 minutes suivant l'extraction.



www.biosellal.com

Support Technique

tech@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 62

Renseignements et commandes

contact@biosellal.com

+33 (0) 4 26 78 47 60

