



Notice d'utilisation
ADI122-SALM_NO_(FR)_V01
02/2023

ADIAVET™ SALMO FAST TIME

Référence : ADI122-100

Test pour la détection de *Salmonella enterica* spp par amplification enzymatique de gène en temps réel

Test PCR – 100 réactions

Usage in vitro et strictement vétérinaire



Echantillon	Analyse individuelle	Analyse en mélange*, possible jusqu'à
Ecouvillon, tissus, liquide stomacal issus d'avortements	✓	✗

* Dépend de la situation épidémiologique, de la qualité de l'échantillon et des directives spécifiques qui existent dans certains pays (s'y référer).

Composition du kit

Matériel fourni		Kit ADI122-100
		100 réactions
A5	Solution d'amplification	2 x 500 µL tubes à bouchon vert (Réactif prêt à l'emploi)
SALMO CTL+	Contrôle positif <i>Salmonella enterica</i> spp	1 tube à bouchon violet (A reconstituer)
EPC-Ext	Contrôle exogène non-cible d'extraction	2 x 300 µL tubes à bouchon jaune (Réactif prêt à l'emploi)
EPC-Amp	Contrôle exogène non-cible d'amplification	1 x 150 µL tube à bouchon incolore (Réactif prêt à l'emploi)
NF-Water	Eau Nucléase Free	1 x 1000 µL tube à bouchon blanc (Réactif prêt à l'emploi)

Historique de révision

Date	Version	Modifications
06/2022	NF122-03	Ajout espèce ovine
02/2023	NF122-SALM_NO_(FR)_V01	Passage au format simplifié

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

A. Introduction

Salmonella est un bacille à gram négatif appartenant à la famille des entérobactéries. Au sein de 2 espèces, *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*, il a été identifié jusqu'à présent plus de 2500 sérotypes ou sérovars différents.

Presque toutes sont pathogènes pour les ruminants. *Salmonella enterica* subspp *enterica* serovars *Typhimurium*, *Dublin* et *Montevideo* sont parmi les plus fréquemment rencontrées chez les bovins. Les symptômes les plus typiques de la salmonellose sont des diarrhées parfois hémorragiques accompagnées de fièvre. La maladie touche des animaux isolés mais peut parfois prendre une forme épidémique, des avortements peuvent également survenir.

Plusieurs sérovars de salmonelles sont capables d'induire des avortements chez les ruminants. Les sérovars les plus régulièrement mis en cause sont *Salmonella enterica* subspp *enterica* *Dublin* pour les avortements bovins et *Salmonella Abortus-Ovis* pour les ovins.

Les avortements dus à une salmonellose ne présentant pas de caractéristiques particulières, le diagnostic passe obligatoirement par des analyses de laboratoire. *Salmonella enterica* subspp *enterica* peut être recherché à partir de liquide stomacal ou d'organe du fœtus (notamment foie, rate), de cotylédon placentaire prélevé en position intra-utérine ou d'écouvillon vaginal.

La *Salmonella enterica* est recherchée par bactériologie ou PCR. La bactériologie consiste à mettre en culture puis éventuellement identifier le sérovar mis en cause, cette méthode nécessite un temps d'analyse de 4 à 7 jours. L'utilisation de la PCR permet, elle, de mettre en évidence la présence de *Salmonella* en quelques heures.

B. Principe du test

Le test ADIAVET™ SALMO FAST TIME repose sur l'amplification génique de fragments d'ADN spécifiques de *Salmonella enterica* spp. Il détecte simultanément en monoculture :

- *Salmonella enterica* spp (sonde marquée en FAM)
- Un contrôle interne exogène (sonde marquée en HEX ou équivalent)
 - Soit d'extraction et d'amplification si l'EPC-Ext est ajouté à l'échantillon au cours de l'extraction des acides nucléiques
 - Soit d'amplification si l'EPC-Amp est ajouté à la solution d'amplification.

C. Conditions de stockage

A réception, le kit doit être stocké à <-15 °C jusqu'à la date de péremption du kit.

Il est recommandé d'aliqoter le réactif « A5 » si le nombre d'analyses à effectuer nécessite plus de trois décongelations.

Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Stocker à l'abri de la lumière.

Ne pas mélanger des réactifs de différents lots.

D. Matériel supplémentaire et réactifs requis non fournis

- Thermocycleur avec son consommable pour PCR Temps réel
- 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 de 1,5 mL et 2 mL
- Gants latex ou nitrile non poudrés
- Eau Nucléase-free
- Kit d'extraction des acides nucléiques

Kits complémentaires pour Adoption de méthode et PCR (U47-600)

- **Extraction Positive Control SALMO (Réf. : ADC12EPC).**
Matériel de référence fournisseur pour adoption de méthode pouvant également être utilisé comme sentinelle (Calibré entre 1 et 100xLD_{Méthode})
- **LD_{PCR} Positive Control – SALMO (Réf. : ADC12LD)**
Confirmation des performances – LD_{PCR} du kit.

E. 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 *Salmonella enterica* spp transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).

F. Extraction des acides nucléiques

1. Kits d'extractions

Les acides nucléiques doivent être extraits à partir des échantillons avant d'utiliser le kit. Les kits d'extraction ADN/ARN listés ci-dessous sont recommandés et fournis par Bio-X Diagnostics :

Nom du produit	Technologie d'extraction	Nombre de tests et référence
ADIAMAG	Billes magnétiques	200 tests : réf. NADI003 800 tests : réf. NADI003-XL

Pour l'extraction, se référer à la version de notice disponible sur le site web, indiqué sur le certificat d'analyse inclus dans le kit PCR utilisé.

D'autres kits d'extraction peuvent être utilisés après validation par l'utilisateur.

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.

2. Témoins

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 réactif (NTC)	Absence de contamination pour l'amplification	5 µL NF-Water dans un puits par série PCR
SALMO CTL+	Amplification de la cible	5 µL CTL+ dans un puits par série PCR
Témoin négatif d'extraction	Absence de contamination pour l'extraction et l'amplification	1 extraction (eau ou tampon de lyse + EPC-Ext) par série d'extraction
Témoin positif d'extraction	Etapes d'extraction et d'amplification	1 extraction (Echantillon positif entre 1 et 100X LD _{METHODE}) par série d'extraction

G. Mode opératoire

1. Utilisation de l'EPC-Ext

L'EPC-Ext doit être ajouté dans tous les échantillons et les témoins d'extraction.

Aliquoter et conserver cette solution à <-15 °C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

Pour chaque extraction, ajouter **5 µL** d'EPC-Ext par échantillon dans le premier tampon de lyse.

2. Utilisation de l'EPC-Amp

L'EPC-Amp est utilisé quand l'EPC-Ext n'a pas été utilisé lors de l'extraction des acides nucléiques.

Aliquoter et conserver cette solution à <-15 °C en fonction de la taille des séries d'extraction. Les aliquotes ne doivent pas subir plus de 3 décongélations.

Pour chaque puits PCR, ajouter **0,5 µL** d'EPC-Amp dans la solution d'amplification. (Se reporter au § « Amplification », Etape 1).

3. Préparation du contrôle CTL+

Ajouter **200 µL** de « NF-Water » par tube.

Homogénéiser le tube à l'aide d'un agitateur de type vortex > 20 secondes jusqu'à dissolution complète du culot bleu.

Après reconstitution, aliquoter et stocker la solution à une température inférieure à -15 °C jusqu'à la date de péremption du kit. Ne pas décongeler plus de 3 fois.

Pour chaque analyse, utiliser **5 µL** du CTL+ dans un des puits dédiés (se reporter au § « Amplification », Etape 2).

4. Amplification

Attention :

- Avant de commencer, décongeler les réactifs à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- Homogénéiser tous les réactifs et échantillons avant utilisation.
- Replacer les réactifs à une température inférieure à -15 °C, après distribution.

Étape 1 :

Si utilisation de l'EPC-Ext à l'extraction :

Répartir **10 µL** de réactif d'amplification A5 dans chaque puits PCR.

Si non-utilisation de l'EPC-Ext à l'extraction :

Placer (n+1) x 10 µL de réactif d'amplification A5 dans un microtube et y ajouter (n+1) x 0,5 µL d'EPC-Amp. Répartir **10 µL** du mélange dans chaque puits PCR.

Étape 2 : Distribuer **5 µL** d'acides nucléiques extraits des échantillons et **5 µL** de contrôles dans chaque puits dédié.

Utiliser le NF-Water pour le témoin réactif.

Étape 3 : Fermer les puits avec un film ou des barrettes adaptés.

Étape 4 : Démarrer l'analyse PCR.

Les programmes suivants ont été développés pour les appareils ABI Prism (type 7500, QuantStudio5, Step-one...) d'Applied Biosystems, pour les Mx3000 et Mx3005P, AriaMx d'Agilent, pour les LightCycler de Roche Diagnostics, pour le Rotor-Gene Q de Qiagen, pour le CFX96 et Chromo 4 de Biorad, pour le MIC de BioMolecular System.

Programme ADN standard		Programme ADN FAST	
2 min. 50 °C		2 min. 95 °C	
10 min. 95 °C			
15 sec. 95 °C**	45 cycles	5 sec. 95 °C	45 cycles
60 sec. 60 °C*		30 sec. 60 °C*	

**30 sec. 95°C pour MX3000 et MX3005P

*Lecture et paramètres pour l'acquisition de la fluorescence :

Fluorochrome	Absorbance (nm)	Emission (nm)
FAM	494	520
HEX ou équivalent	538	554
ROX	575	602

Note : Le Quencher est non fluorescent. Le mélange contient une référence passive lue dans le spectre du ROX pour les appareils ABI Prism.

Contacter votre représentant commercial ou le service client pour tout autre modèle de thermocycleur.

H. Interprétation des résultats

1. Validation de l'essai

L'amplification est valide si les résultats suivants sont obtenus.

Les valeurs indicatives de Ct (Threshold Cycle) attendues pour le CTL+ sont indiquées sur le certificat d'analyse du kit.

Contrôles	Amplification		Validation de
	FAM	HEX ou équivalent	
Témoin réactif (NTC)	Non	Oui*/Non	Absence de contamination pour l'amplification
SALMO CTL+	Oui	Oui*/Non	Amplification de la cible
Témoin négatif d'extraction	Non	Oui	Absence de contamination pour l'extraction
Témoin positif d'extraction	Oui	Oui	Etapes d'extraction et d'amplification

*Oui si ajout de l'EPC-Amp avant amplification.

2. Interprétation des résultats

L'extraction des acides nucléiques et l'amplification sont **valides** pour chacun des échantillons si au moins une courbe d'amplification caractéristique est observée en FAM, et/ou HEX ou équivalent.

Amplification		Interprétation
FAM	HEX ou équivalent	Salmonella enterica spp
Non	Oui	Non détecté
Oui	Oui	Détecté
Oui	Non	Détecté
Non	Non	Non déterminé

« **Non déterminé** » : absence de courbe d'amplification caractéristique.

Causes possibles :

PCR défectueuse (présence d'inhibiteurs, erreur de programme, absence d'échantillon ou échantillon trop dégradé) et/ou Déficience de l'extraction des acides nucléiques (perte ou destruction des acides nucléiques).

Actions conseillées :

Refaire la PCR avec l'extrait des acides nucléiques pur et dilué au 1/10^{ème} en eau Nucléase-free ;

Refaire l'extraction des acides nucléiques si le test n'est toujours pas valide ou redemander un autre prélèvement.

Table 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
	Pour usage vétérinaire <i>in vitro</i> uniquement – Pour usage animal uniquement
	Conserver à l'abri de la lumière

- 1 | Extraire les acides nucléiques avec

**Adia^X
Mag**



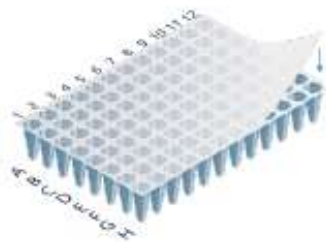
Scan me to
discover Adiamag™

Si utilisation de l'EPC-Ext:

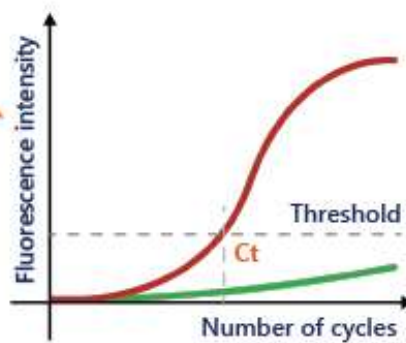
- 2 | Répartir **10 µL** de réactif
d'amplification **A5**

- 3 | Distribuer **5 µL d'acides nucléiques**,
CTL+ et **NF-Water**

- 4 | Sceller les puits



- 5 | Démarrer l'analyse PCR



* Les notes ne se substituent pas au mode d'emploi dont elles sont une synthèse.

Si non-utilisation de l'EPC-Ext:

- 2 | Préparer un prémélange de **10 µL** de réactif
d'amplification **A5** + **0,5 µL d'EPC-Amp**
Répartir **10 µL** du prémélange

