

MANUEL D'UTILISATION

Bio-T kit[®] *Salmonella spp*

Cat. N° BioTK047 - 50 réactions

**Détection de *Salmonella spp*
par PCR en temps réel (qPCR)
avec contrôle positif interne (IPC) endogène et contrôle
interne (IC) exogène**

RUMINANTS

Types de prélèvements

- Mucus vaginal/endocervical, cotylédons placentaires prélevés à l'aide d'écouvillons secs, avec embout viscosse et tige souple en plastique
- Organes de fœtus : foie, rate
- Liquide fœtal stomacal
- Lait
- Fèces
- Conservation recommandée des échantillons :
à 4°C 7 jours maximum, -20°C au-delà de 7 jours, voire -70°C au-delà de 1 an.

Extractions ADN recommandées par BioSella

- Billes magnétiques (ex : BioSella – BioExtract[®] SuperBall[®] Cat. N° BES384)
- Colonnes de silice (ex : BioSella – BioExtract[®] Column Cat. N° BEC050 ou BEC250 ; Qiagen -QIAamp[®] DNA mini kit Cat N°51304)

D'autres kits d'extraction sont utilisables : contacter le support technique pour plus d'informations.

Réservé à l'usage vétérinaire



PRESENTATION

Description du Bio-T kit® *Salmonella spp*

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des entérobactéries, Gram négatif présentes dans le sol et l'eau. Ingérées, elles colonisent le tube digestif de nombreuses espèces d'animaux (mammifères, reptiles, oiseaux, ...) et des humains et se retrouvent dans les déjections où elles peuvent survivre 1 à 3 mois.

La salmonellose est une zoonose, des précautions particulières sont à prendre lors de la manipulation des prélèvements. Chez les bovins, la salmonellose se caractérise principalement par des entérites et des avortements.

Il existe plus de 2500 types de Salmonelles appartenant à 3 espèces différentes (*enterica* (majeure), *bongori* et *subterranea*). La plupart sont pathogènes pour les ruminants.

Du fait de leur importance en santé vétérinaire et aussi publique, la détection de Salmonelles représente un enjeu économique important.

Le Bio-T kit® *Salmonella spp* (BioTK047) permet de **détecter dans le même puits réactionnel, la présence** :

- de ***Salmonella spp*** grâce à un marquage 6-FAM,
- d'un **IPC endogène** (*Gapdh*, ruminants), grâce à un marquage VIC qui permet de confirmer la présence de cellules de ruminants en quantité suffisante sur les écouvillons et exsudats d'organes, de valider l'intégrité des acides nucléiques (AN) dans les échantillons, la qualité de l'extraction des AN et l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.
- d'un **IC exogène**, grâce à un marquage CY5, à ajouter lors de l'extraction des AN à partir d'échantillons pauvres en cellules (fèces, voire lait), et permettant de vérifier la qualité de l'extraction et l'absence d'inhibition de la réaction d'amplification.

Ce kit, basé sur une détection qualitative de *Salmonella spp* (détecté ou non détecté) à partir de prélèvements de mucus génital, d'organes, de lait ou de fèces, a été développé et validé suivant les prescriptions de la **norme NF U47-600-2 éditée par l'AFNOR**.

Ce kit appartient à la **gamme qPCR REPRO de BioSellal** avec des protocoles communs d'extraction et de PCR (informations disponibles sur www.biosellal.com).

Description des étapes à suivre de l'échantillon jusqu'au résultat de qPCR

Etape 1 : Préparation des échantillons et Lyse des cellules incluant les bactéries.

Etape 2 : Extraction/Purification des Acides Nucléiques (AN).

Etape 3 : Dépôt du Master Mix dans les puits de la plaque ou des barrettes de qPCR.

Etape 4 : Ajout des extraits d'AN.

Etape 5 : PCR en temps réel (qPCR) : amplification et détection simultanée des ADN cible de *Salmonella spp* et non cibles des IPC et IC.

Contenu du kit et conditions de conservation

Tableau 1. Descriptif du contenu du kit				
Description	Référence	Volume /tube	Présentation	Conservation
Master Mix (MM) Prêt à l'emploi	MMSal-B	2 x 410 µl	2 tubes bouchon blanc Sachet A	-20°C à l'abri de la lumière Zone « MIX »
Internal Control (IC) exogène = Contrôle d'amplification exogène	IPC-A	275 µl	1 tube bouchon rose Sachet B	-20°C Zone « Extraction »
External Positive Control (EPC) = Contrôle positif d'amplification de <i>Salmonella</i>	EPCSal-A	120 µl	1 tube bouchon orange Sachet C	-20°C Zone « Ajout d'AN »
Eau RNase/DNase free	Aqua-A	1 ml	1 tube bouchon bleu Sachet C	4°C ou -20°C Zone « Ajout d'AN »

Les réactifs du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le sachet, sous réserve du bon respect des conditions de conservation.

Liste des consommables et réactifs non fournis dans le kit

Tableau 2. Consommables et réactifs non fournis dans le kit

Consommable / Réactif	Description	Fournisseur	Cat. N°
Tampon ATL	Tampon de Lyse	BioSella	ATL19076
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (50)	BioSella	BEC050
BioExtract® Column	Kit d'extraction ADN/ARN format colonne (250)	BioSella	BEC250
BioExtract® SuperBall®	Kit d'extraction ADN/ARN format billes magnétiques (4 x 96)	BioSella	BES384
QIAamp® DNA mini kit	Kit d'extraction ADN format colonne (50)	Qiagen	51304

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

Principales précautions à appliquer

- A réception des prélèvements, **désinfecter l'extérieur des contenants à l'aide d'un désinfectant large spectre et 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 et à la présence potentielle de *Salmonella spp* ou de *Coxiella burnetii* et des propriétés aérolisables de cette dernière.**
- Porter les équipements de protection individuelle appropriés (blouse, gants jetables (système de double paire), lunettes de protection, masque FFP3...).
- 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 MIM prêts à l'emploi, préparation de plaques qPCR), « Ajout d'AN » (stockage et addition des AN 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 -20°C avant utilisation.
- Vortexer et centrifuger rapidement (centrifugeuse de paillasse) tous les réactifs 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 AN extraits. Suivant votre utilisation, nous vous préconisons de faire des fractions aliquotes de volume adéquat.

PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS et EXTRACTION D'ADN

Après une étape de prétraitement des échantillons (cf ci-dessous), le processus d'extraction comprend une étape de lyse thermique et enzymatique, avec étape d'inactivation bactérienne, suivie de la purification des ADN totaux libérés par adsorption sur colonne de silice ou sur billes magnétiques coatées. Les ADN purifiés élués sont ensuite stockés à 4°C si la PCR est réalisée dans la journée ou à -20°C pour un traitement ultérieur.

BioSellal propose deux kits d'extraction :

- **BioExtract® Column (Cat. N° BEC050 ou BEC250)** basé sur l'utilisation de colonnes de silice, préconisé pour l'extraction de 1 à 12-20 échantillons en parallèle.
- **BioExtract® SuperBall® (Cat. N° BES384)** basé sur l'utilisation de billes magnétiques et l'utilisation d'automates tels que le KingFisher™ Duo, mL ou Flex, préconisé pour l'extraction en parallèle de 12 échantillons ou plus.

Le kit **QIAamp® DNA mini kit de Qiagen (Cat. N°51304)**, colonnes de silice) a également été validé sur prélèvements d'avortement.

Un protocole simplifié pour chaque méthode et commun à tous les kits de la gamme REPRO vous est proposé ci-après. Pour plus d'informations, contacter notre support technique ou se reporter au manuel d'utilisation dédié sur www.biosellal.com.

L'extraction des ADN totaux est réalisable avec toute autre technique d'extraction validée.

Préparation des échantillons avant extraction : sous PSM

Contrôles requis

Pour chacune des méthodes d'extraction, il est obligatoire d'inclure au moins **un échantillon « témoin négatif d'extraction (NCS) »**, afin de valider l'absence d'inter-contamination des échantillons sur l'ensemble du processus. Il est placé en dernière position, après les échantillons à extraire, et il est recommandé d'adapter le nombre de NCS au niveau de risque d'inter-contamination du laboratoire : par exemple, un NCS tous les 7-10 échantillons terrain.

Pour ce contrôle, la **prise d'essai de 200 µl** est remplacée par **200 µl de PBS ou d'eau (RNase/DNase free)** et est traitée en parallèle des échantillons terrains tout au long du processus d'extraction.

Echantillons

A partir d'écouvillons

1. Eluer l'écouvillon avec du PBS 1X stérile :
 - Placer l'écouvillon dans un tube 1.5 ml et couper la tige de l'écouvillon.
 - Ajouter 1 ml de PBS 1X stérile.
 - Fermer le tube et vortexer 5 secondes à 2 reprises puis centrifuger rapidement.
 - Enlever l'écouvillon en le pressant sur les parois pour minimiser les pertes de volume.
2. L'extraction sera réalisée à partir de **200 µl de l'éluat** (ou 200 µl de PBS pour le NCS)
Le reste de l'éluat devra être conservé à 4°C temporairement (4h), au-delà il devra être conservé à -20°C jusqu'à une prochaine extraction si nécessaire.

A partir d'échantillons liquides

Après avoir bien homogénéisé l'échantillon (vortexer 5 secondes à 2 reprises puis centrifuger rapidement) : prélever **200 µl** comme prise d'essai et procéder au protocole d'extraction.

A partir d'organes

1. Prélever **20-30 mg d'organe** (balance de précision), à déposer sur une boîte de Pétri stérile.
2. Hacher finement les 20-30 mg avec scalpel/pince stériles.
3. Transférer dans un tube contenant **250 µl de tampon PBS stérile** puis vortexer 1 minute.
Conserver la suspension à 4°C temporairement (4h) sinon à -20°C et procéder de la même façon pour le reliquat d'organe.
4. Procéder à l'extraction à l'aide des kits BioExtract® Column, BioExtract® SuperBall® ou QIAamp® DNA mini kit, à partir de **200 µl d'organe dilacéré re-suspendu** (ou de PBS pour le NCS).

A partir de fèces

1. Peser **1 g de fèces** et transférer dans 1 tube contenant 4 ml d'eau UltraPure ou DNase/RNase free et des billes de verre.
2. Vortexer et laisser décanter 10 minutes.
3. Transférer 1.4 ml du surnageant dans un tube stérile de 2 ml.
4. Centrifuger le tube à 13 000 x g pendant 10 minutes
5. Eliminer le surnageant et reprendre le culot bactérien avec 350 µl de tampon ATL
6. Procéder à l'extraction à l'aide des kits BioExtract® Column, BioExtract® SuperBall® ou QIAamp® DNA mini kit, à partir de **200 µl de prise d'essai** (échantillon pré-traité ou PBS pour le NCS).

Extraction des ADN

Pour les échantillons nécessitant un contrôle interne exogène (matrice de type fèces), l'IC exogène (tube IPC-A, bouchon **rose**) fourni dans le Bio-T kit® *Salmonella spp*, doit être utilisé lors de l'étape d'extraction des AN comme décrit ci-après pour les différents kits proposés. En cas d'oubli, l'IC peut être ajouté au moment de la préparation de la plaque qPCR.

Extraction sur colonnes

Kit BioExtract® Column (BioSella)

Cat. N° BEC050 ou BEC250

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

Sous PSM, dans un tube de 1.5 ml :

Ajouter **20 µl de Protéinase K**,

Ajouter **180 µl de tampon ATL** et **1 µl carrier RNA** et **5 µl d'IC** (tube IPC-A, bouchon **rose**),

Ajouter **200 µl d'échantillon prétraité** (ou PBS pour le contrôle négatif) préalablement vortexé.

Vortexer 2 x 5 sec et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

Incuber 30 min à 70°C.

Cette étape permet la lyse des bactéries et conduit à l'inactivation des bactéries dont *Coxiella*, potentiellement présentes dans l'échantillon. **A partir de cette étape, il est possible de travailler hors PSM.**

Centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) puis ajouter **350 µl de Buffer LB**.

Vortexer puis centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

2. Adsorption sur la membrane de silice

Transférer délicatement 400 µl de lysat sur la colonne BioExtract® Mini Spin Column (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).

Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min.

Déposer le reliquat de lysat (environ 350 µl) et **reproduire l'étape précédente.**

Changer de tube collecteur (Mettre la colonne BioExtract® dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter **600 µl de Buffer W1.**

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min.** Changer de tube collecteur.

Ajouter **600 µl de Buffer W2.**

Centrifuger à **6 000 x g pendant 1 min.** Changer de tube collecteur.

Centrifuger à **20 000 x g pendant 2 min** pour sécher la membrane.

4. Elution des acides nucléiques

Mettre la colonne BioExtract® Mini Spin Column dans un **nouveau tube de 1.5 ml**, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter **200 µl** de **Buffer EL** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.

Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant **1 min**.

Centrifuger à **20 000 x g** pendant **1 min**.

Conserver l'éluat contenu dans le tube de 1.5 ml et jeter la colonne.

L'ADN extrait peut être **conservé à 4°C** si la **qPCR est lancée dans la journée**, sinon il est **recommandé de le conserver à <-20°C**.

Figure 1. Extraction avec le kit BioExtract® Column
(Cat. N° BEC050 ou BEC250, BioSella)

<p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p>	 <p>Sous PSM</p> <ul style="list-style-type: none"> 20 µl de Protéinase K 180 µl de Tampon ATL + 1 µl carrier + 5 µl IC 200 µl d'échantillon Vortex + centrifugation rapide Incubation 30 min 70°C re-centrifugation rapide 350 µl de Buffer LB Vortex + centrifugation rapide 												
<p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p>	 <p>Charger délicatement la colonne BioExtract® Mini Spin Column</p> <p> 6 000 x g 1 min</p>												
<p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p>	 <table border="0"> <tr> <td>1^{er} Lavage</td> <td>600 µl W1</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>2nd Lavage</td> <td>600 µl W2</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td></td> <td>20 000 x g 2 min</td> </tr> </table>	1^{er} Lavage	600 µl W1		6 000 x g 1 min	2nd Lavage	600 µl W2		6 000 x g 1 min	-	-		20 000 x g 2 min
1^{er} Lavage	600 µl W1		6 000 x g 1 min										
2nd Lavage	600 µl W2		6 000 x g 1 min										
-	-		20 000 x g 2 min										
<p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p>	 <p>200 µl de Buffer EL</p> <p>Température ambiante 1 min</p> <p> 20 000 x g 1 min</p>												

QIAamp® DNA mini kit (Qiagen)

Cat. N° 51304

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption

Sous PSM, dans un tube de 1.5 ml :

Ajouter **20 µl de Protéinase K**,

Ajouter **180 µl de tampon ATL + 5 µl d'IC** (tube IPC-A bouchon **rose**),

Ajouter **200 µl d'échantillon prétraité** (ou PBS pour le contrôle négatif) préalablement vortexé.

Vortexer 2 x 5 sec et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

Incuber 30 min à 70°C.

Cette étape permet la lyse des bactéries et conduit à l'inactivation des bactéries dont *Coxiella*, potentiellement présentes dans l'échantillon.

A partir de cette étape, il est possible de travailler hors PSM.

Centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse) puis ajouter **200 µl de Buffer AL**.

Vortexer puis centrifuger brièvement.

Incuber 10 min à 70°C

Centrifuger brièvement.

Ajouter **200 µl d'éthanol 100%**

Vortexer puis centrifuger brièvement.

2. Adsorption sur la membrane de silice

Transférer délicatement 400 µl de lysat sur la colonne QIAamp® (déjà placée dans un tube collecteur de 2 ml).

Centrifuger à 6 000 x g pendant 1 min.

Déposer le reliquat de lysat (environ 400 µl) et **reproduire l'étape précédente.**

Changer de tube collecteur (Mettre la colonne dans un nouveau tube collecteur et jeter le tube collecteur contenant le filtrat).

3. Lavages et Séchage de la membrane de silice

Ajouter **500 µl de Buffer AW1.**

Centrifuger à **6 000 x g** pendant **1 min.** Changer de tube collecteur.

Ajouter **500 µl de Buffer AW2.**

Centrifuger à **20 000 x g** pendant **3 min.** Changer de tube collecteur.

Centrifuger à **20 000 x g** pendant **1 min** pour sécher la membrane.

4. Elution des acides nucléiques

Mettre la colonne QIAamp® dans un **nouveau tube de 1.5 ml**, et jeter le tube collecteur contenant le filtrat.

Ajouter **200 µl de Buffer AE** (à température ambiante) délicatement au centre de la membrane.

Incuber à température ambiante (15–25°C) pendant **1 min.**

Centrifuger à **6 000 x g** pendant **1 min.**

Conservé l'éluat contenu dans le tube de 1.5ml et jeter la colonne.

L'ADN extrait peut être **conservé à 4°C** si la **qPCR est lancée dans la journée**, sinon il est **recommandé de le conserver à <-20°C.**

Figure 2. Extraction avec le kit QIAamp® DNA mini kit
(Cat. N° 51304, Qiagen)

<p>1</p> <p>Lyse et Ajustement des conditions d'adsorption</p>	 <p>Sous PSM</p> <ul style="list-style-type: none"> 20 µl de Protéinase K 180 µl de Tampon ATL + 5 µl IC 200 µl d'échantillon Vortex + Centrifugation rapide Incubation 30 min 70°C re-centrifugation rapide <ul style="list-style-type: none"> 200 µl de Tampon AL Vortex + Centrifugation rapide Incubation 10 min 70°C <ul style="list-style-type: none"> 200 µl d'éthanol 100% Vortex + Centrifugation rapide 												
<p>2</p> <p>Adsorption sur la membrane de silice</p>	 <p>Charger délicatement la colonne QIAamp® Mini Column</p> <p> 6 000 x g 1 min</p>												
<p>3</p> <p>Lavages</p> <p>Séchage de la membrane de silice</p>	 <table border="0"> <tbody> <tr> <td>1^{er} Lavage</td> <td>500 µl AW1</td> <td></td> <td>6 000 x g 1 min</td> </tr> <tr> <td>2nd Lavage</td> <td>500 µl AW2</td> <td></td> <td>20 000 x g 3 min</td> </tr> <tr> <td>-</td> <td>-</td> <td></td> <td>20 000 x g 1 min</td> </tr> </tbody> </table>	1 ^{er} Lavage	500 µl AW1		6 000 x g 1 min	2 nd Lavage	500 µl AW2		20 000 x g 3 min	-	-		20 000 x g 1 min
1 ^{er} Lavage	500 µl AW1		6 000 x g 1 min										
2 nd Lavage	500 µl AW2		20 000 x g 3 min										
-	-		20 000 x g 1 min										
<p>4</p> <p>Elution des acides nucléiques</p>	 <p>200 µl de Buffer AE (Température Ambiante (TA))</p> <p>TA 1 min</p> <p> 6 000 x g 1 min</p>												

Extraction avec billes magnétiques

Kit BioExtract® SuperBall® (BioSella)

Cat. N° BES384

Pour utilisation avec KingFisher™ Flex, Duo ou mL

Se reporter au protocole du kit d'extraction pour la préparation des solutions

1. Lyse cellulaire

Sous PSM, dans un tube de 1.5 ml, ajouter :

20 µl de Protéinase K,

180 µl de Tampon ATL,

200 µl d'échantillon prétraité (ou PBS pour le contrôle négatif) préalablement vortexé.

Vortexer 2 x 5 sec et centrifuger brièvement (centrifugeuse de paillasse).

Incuber 30 min à 70°C.

Cette étape permet la lyse des bactéries et conduit à l'inactivation des bactéries dont *Coxiella*, potentiellement présentes dans l'échantillon. **A partir de cette étape, il est possible de travailler hors PSM.**

2. Préparation des plaques ou barrettes

Préparer les consommables pour la série d'extraction :

Flex : 4 plaques Deep-wells et 2 microplaques. Les annoter en fonction de l'élément à ajouter (voir Tableau 4).

Duo : 1 plaque Deep-well et 1 barrette d'élution.

mL : 1 barrette par échantillon. Sortir le plateau coulissant de l'automate et positionner les barrettes dessus.

Préparer la solution LB-SMB-carrier + IC comme indiqué ci-dessous :

Tableau 3 : Solution de lyse LB-SMB-carrier + IC exogène							
Réactif	Nombre d'échantillons*						
	1	5	10	12	15	48	96
Buffer LB	400 µl	2.2 ml	4.4 ml	5.28 ml	6.6 ml	21.12 ml	42.24 ml
SMB (SuperBall Magnetic Beads)‡	25 µl	137.5 µl	275 µl	330 µl	412.5 µl	1.32 ml	2.64 ml
Carrier RNA(1 µg/µl)	1 µl	5.5 µl	11 µl	13.2 µl	16.5 µl	52.8 µl	105.6 µl
IC exogène (tube bouchon rose)	5 µl	27.5 µl	55 µl	66 µl	82.5 µl	264 µl	528 µl

* Pour compenser les erreurs de pipetage, le volume préparé inclut 10% de volume supplémentaire par rapport au volume requis. Le volume de tampon en excès peut être conservé en vue d'une utilisation sous 8 jours ; au-delà de cette durée, il doit être jeté.

‡ Vortexer vigoureusement pendant 3 minutes avant la première utilisation ou 1 minute pour les utilisations suivantes.

Au fond des puits de la « Deep-well Lysat » (Flex), des puits de la ligne A (Duo) ou des puits en position A des barrettes (mL), **transférer** :

400 µl de lysat après avoir vortexé le tube et centrifugé rapidement.

400 µl de solution de lyse LB-SMB-carrier+ IC préalablement vortexée vigoureusement (30 sec).

Distribuer les autres réactifs, en suivant les indications présentées dans le Tableau 4 ci-après.

Tableau 4 : Volume des réactifs et Configuration des automates KingFisher™ Flex, Duo et mL				
Position sur la barrette ou la plaque			Élément à ajouter	Volume par puits (µl)
Flex	Duo*	mL		
Deep-well Lysat	Ligne A	Position A	Lysat†	800†
Deep-well Wash 1	Ligne E	Position B	Buffer W1	700
Deep-well Wash 2	Ligne F	Position C	Buffer W2	700
Deep-well Wash 3	Ligne G	Position D	Ethanol (96–100%)	750
Microplaque Elution	Elution strip	Position E	Buffer EL	200
Microplaque Peigne (Large 96-Rod Cover)	Ligne B	<i>A positionner manuellement</i>	Peigne	—

* Les lignes C, D et H sont vides.

† Inclut 400 µl d'échantillon prétraité et 400 µl de solution LB-SMB-carrier.

3. Lancement du KingFisher™

Placer les plaques dans l'automate en ayant sélectionné le programme « **BioExtract_KF_Flex** », « **BioExtract_KF_Duo** » ou « **BioExtract_KF_mL** » et démarrer.

En fin de programme, récupérer les éluats (microplaque Elution pour KingFisher™Flex, Elution strip pour KingFisher™ Duo ou puits E pour KingFisher™mL).

L'ADN extrait (plaque ou puits fermé ou microtube) peut être **conservé à 4°C si la qPCR est lancée dans la journée, sinon il est recommandé de le conserver à <-20°C.**

Figure 3. Extraction d'ADN avec le kit BioExtract® SuperBall®
(Cat. N° BES384, BioSellal)

	KingFisher™ Flex	KingFisher™ Duo	KingFisher™ mL	Élément à ajouter
1 Lyse Sous PSM	Dans tube 1.5 ml stérile			200 µl d'échantillon + 20 µl Protéinase K + 180 µl de Tampon ATL Incubation 30min à 70°C
2 Préparation des plaques ou barrettes	Deep-well Lysat  Deep-well Wash 1  Deep-well Wash 2  Deep-well Wash 3  microplaque Elution  microplaque Peigne 	Ligne A  Ligne E  Ligne F  Ligne G  Elution strip  Ligne B  (Lignes C, D et H vides)	Position A  Position B  Position C  Position D  Position E  Le peigne est placé manuellement	↓ 400 µl de Lysat + 400 µl de solution LB-SMB-carrier + IC (Pour 1 : 400 µl Buffer LB + 25 µl SMB + 1 µl carrier RNA + 5 µl IC) 700 µl de Buffer W1 700 µl de Buffer W2 750 µl d'éthanol (96-100%) 200 µl de Buffer EL Peigne (Rod Cover)
3 KingFisher™	<ul style="list-style-type: none"> • Allumer le KingFisher™ Flex, Duo ou mL. • Ouvrir la porte du couvercle protecteur. • Sélectionner le programme BioExtract® SuperBall® souhaité à l'aide des touches fléchées. • Appuyer sur START (Démarrer) et suivre les messages pour charger l'appareil. 			

Pour avoir le programme KingFisher™ adéquat selon la version de l'automate, veuillez contacter notre support technique (tech@biosellal.com).

DETECTION de *Salmonella spp* par qPCR Kit BioTK047

Procédure globale à suivre

- 1) **Etablir un plan de plaque** définissant la position de chaque échantillon et **incluant les contrôles** décrits ci-dessous :
 - **Contrôle négatif de processus (NCS)** : l'eau (ou PBS) remplace l'échantillon depuis le stade initial d'extraction.
Ce contrôle est obligatoire pour chaque série d'extraction.
 - **Contrôle négatif d'amplification (NC)** : 5 µl d'eau RNase/DNase free remplace les 5 µl d'extrait ADN au moment du dépôt sur plaque qPCR. Le tube Aqua-A (bouchon **bleu**) fourni peut être utilisé.
Ce contrôle est recommandé lors de la 1^{ère} utilisation du kit ou pour vérifier l'absence de contamination du master mix suite à un résultat non conforme avec le NCS.
 - **Contrôle positif d'amplification de *Salmonella spp* (EPC)** : il s'agit d'un ADN synthétique fourni (tube EPCSal-A, bouchon **orange**), titré, contenant la séquence cible spécifique de *Salmonella spp*.
Ce contrôle est obligatoire.
- ⚠ **ATTENTION** : *La manipulation du tube EPC représente un risque de contamination, il est recommandé de ne l'ouvrir et de ne le manipuler que dans une zone délimitée, éloignée des autres composants et de prendre les précautions nécessaires pour éviter toute contamination croisée avec des échantillons lors du dépôt sur plaque.*

2) Préparation de la plaque

Dans la zone réservée au «MIX »

1. Après décongélation, vortex et rapide centrifugation, **transférer 15 µl de Master Mix MMSal-B (tube bouchon blanc)** dans chaque puits d'intérêt (échantillons et contrôles).

Dans la zone dédiée à l'ajout de l'AN

2. **Ajouter 5 µl d'ADN extrait (ou NCS ou eau ou EPC: tube EPCSal-A bouchon orange)** par puits d'intérêt, en veillant à les déposer bien au fond du puits, dans le Master Mix et en évitant de faire des bulles.

Note : dans le cas où l'IC exogène n'aurait pas été ajouté lors de l'extraction des échantillons, il est possible de l'ajouter au moment de la préparation de la plaque qPCR. - ajouter 1 µl d'IC (bouchon **rose**) en plus de l'ADN extrait.

- ou ajouter directement l'IC (1 µl/réaction) dans un aliquote de Master Mix avant de déposer 16 µl de ce mélange dans chaque puits d'intérêt et d'y ajouter 5 µl d'AN.

3. **Filmer la plaque** avec le film optique ou fermer les tubes avec les capuchons optiques adaptés.

Dans la pièce dédiée à l'amplification PCR

4. **Paramétrer le thermocycleur** (voir Tableaux 5 et 6).

5. Il est recommandé de **centrifuger la plaque avant de la positionner dans le thermocycleur**, ceci permettra d'éviter la présence de gouttes sur les parois et d'éliminer au maximum les bulles.

6. **Démarrer le programme**. Durée de run approximative de 65 min.

3) Paramètres de réglage du thermocycleur

Ce kit a été développé sur ABI PRISM® 7500 Fast (Applied BioSystems) en ramping standard et confirmé sur AriaMx™ (Agilent) (ramping Fast par défaut) et sur ABI PRISM® 7500 Fast en ramping Fast. Pour d'autres thermocycleurs, contacter notre support technique.

	ABI PRISM® 7500 Fast	AriaMx™
Mode	Quantitation – Standard curve	Quantitative PCR, Fluorescence Probe
Ramping	Ramping Standard ou Ramping Fast	Ramping Fast par défaut
Référence passive	ROX	ROX

Tableau 5. Paramètres de réglage du thermocycleur			
Cible	Détecteurs		Volume final/ puits
	Reporter	Quencher	
<i>Salmonella spp</i>	FAM	NFQ-MGB ou None*	20 µl = 15 µl MM + 5 µl ADN extrait ou contrôles†
IPC endogène	VIC	NFQ-MGB ou None*	
IC exogène	CY5	NFQ-MGB ou None*	
à attribuer aux échantillons et contrôles†			

* Choix variable suivant le modèle de thermocycleur, si besoin contacter le Support Technique de BioSella (tech@biosellal.com)

† Les contrôles sont les NC (eau), NCS (eau extraite) et EPC (ADN cible *Salmonella*).

Tableau 6. Paramétrage du Programme d'amplification		
Ramping Standard ou Fast		
Cycles	Temps	Température
1 cycle	5 min	95°C
40 cycles	15 s	95°C
	30 s* + acquisition des données	60°C

* Régler sur 31 sec pour certains thermocycleurs comme l'ABI PRISM® 7500.

NB :

Le Programme d'amplification est compatible avec l'ensemble des Bio-T kits® à l'exception des kits de la gamme PIG. La réalisation d'une étape de transcription-reverse (RT) préalable à la PCR pour l'amplification des génomes à ARN n'a pas d'incidence sur l'efficacité du Bio-T kit® *Salmonella spp* (données présentées dans le dossier de validation disponible sur demande).

INTERPRETATION DES RESULTATS

Afin d'analyser et d'interpréter les signaux obtenus après qPCR, il est nécessaire de placer la ligne seuil ou « threshold ». Elle doit être positionnée soigneusement afin d'obtenir le résultat le plus reproductible possible entre les différentes manipulations selon les paramètres définis dans l'Annexe C de la norme NF U47-600-1. Pour cela, on utilise un ensemble cohérent de signaux positifs, a minima le témoin positif (EPC), et on place la ligne seuil au-dessus du bruit de fond, et dans la zone exponentielle d'amplification.

Le cycle seuil, nommé « Ct » ou « Cq » en fonction des thermocycleurs, correspond à l'intersection entre les courbes d'amplification et la ligne seuil. Il permet la mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de PCR lorsqu'un extrait calibré est analysé dans la même série.

La série de qPCR est validée si les contrôles (EPC, NCS ou NC) fournissent des résultats valides, puis le résultat de chaque échantillon peut être interprété.

Principaux cas de figures

▪ Lecture des Contrôles

Tableau 7. Différents scénarios de résultats concernant les contrôles				
	Cibles			Interprétation
	<i>Salmonella</i> <i>spp</i> (FAM)	IPC endogène (VIC)	IC exogène (CY5)	
NCS = Contrôle Négatif de processus OBLIGATOIRE	Neg	Neg	Pos	Validé
	Neg / Pos	Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de l'extraction ou de la préparation de plaque.
	Neg	Neg	Neg	<ul style="list-style-type: none"> Oubli de l'ajout d'ADN IC lors de l'extraction ? Problème lors de la PCR : Erreur de master mix ?
NC = Contrôle Négatif d'amplification FACULTATIF	Neg	Neg	Neg	Validé
	Neg / Pos	Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> Contamination avec un échantillon négatif/positif lors de la préparation de la plaque ou contamination du Master Mix.
EPC = Contrôle Positif d'amplification Détection de <i>Salmonella spp</i> OBLIGATOIRE	Pos Ct conforme au Certificat d'Analyse	Neg	Neg	Validé
	Neg	Neg	Neg	<ul style="list-style-type: none"> Problème lors de la PCR : Erreur de master mix ? Oubli de l'EPC ?
	Pos	Pos	Pos	<ul style="list-style-type: none"> Contamination avec un extrait négatif/positif lors de la préparation de plaque.

Rappels :

L'IPC endogène a pour cible un gène exprimé par les cellules de ruminants donc il ne peut être détecté en qPCR à partir des NCS, NC et EPC.

L'IC exogène a pour cible un gène absent du génome des cellules de ruminants ou des génomes bactériens ou viraux, donc il ne peut être détecté en qPCR que si l'ADN a été ajouté lors de l'extraction ou lors de la qPCR.

Lecture des Echantillons extraits

- Si l'IC exogène n'a pas été ajouté lors de la phase d'extraction des AN :

Tableau 8. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles		Interprétation
<i>Salmonella spp</i> (FAM)	IPC endogène (VIC)	
Neg Ct>40	Pos Ct <35	Négatif ou Non détecté
Pos Ct<40		Positif ou Détecté
Pos Ct<40	Neg ou Ct >35	<p>Positif ou Détecté</p> <ul style="list-style-type: none"> Absence de cellules en quantité suffisante Présence d'inhibiteurs ? * Compétition avec la cible ?
Neg Ct>40	Neg ou Ct >35	<p>Ininterprétable</p> <ul style="list-style-type: none"> Oubli d'addition d'ADN extrait ou dépôt non au contact du MM lors de la préparation de la plaque ? Présence d'inhibiteurs dans l'échantillon ? * Problème de prélèvement (cas des écouvillons) : quantité de cellules insuffisante Problème lors de l'extraction ?

* En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qPCR en pré-diluant l'ADN extrait au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

- Si l'IC exogène a été ajouté lors de la phase d'extraction des AN :

Tableau 9. Différents types de résultats pouvant être obtenus pour les échantillons

Cibles			
<i>Salmonella spp</i> (FAM)	IPC endogène (VIC)	IC exogène (CY5)	Interprétation
Neg Ct>40	Pos Ct <35	Pos Ct conforme au Certificat d'Analyse (CA)	Négatif ou Non détecté
		Neg ou Ct >35	Ininterprétable – risque de non détection d'un échantillon faiblement positif ▪ Présence d'inhibiteurs ?* ▪ Problème lors de l'extraction : oubli d'ajout d'IC ?
Pos Ct conforme au CA		Positif ou Détecté	
Neg ou Ct >35		Positif ou Détecté ▪ Présence d'inhibiteurs ?* ▪ Pas de quantification relative envisageable ▪ Problème lors de l'extraction : oubli d'ajout d'IC ?	
Pos Ct<40	Neg ou Ct >35	Pos Ct conforme au CA	Positif ou Détecté ▪ Absence de cellules en quantité suffisante ? ▪ Compétition avec la cible ?
		Neg ou Ct >35	Positif ou Détecté ▪ Présence d'inhibiteurs ?* ▪ Pas de quantification relative envisageable ▪ Compétition avec la cible ?
Pos Ct conforme au CA		Ininterprétable – risque de non détection d'un échantillon faiblement positif ▪ Problème de prélèvement (cas des écouvillons) : quantité de cellules insuffisante ▪ Problème lors de la lyse ?	
Neg Ct>40		Neg ou Ct >35	Ininterprétable ▪ Présence d'inhibiteurs ?* ▪ Problème lors du dépôt de l'AN extrait dans la plaque qPCR ?

* En cas de suspicion d'inhibition, 1) Répéter la qPCR en pré-diluant l'ADN extrait au 1/10 voire au 1/100 dans de l'eau DNase/RNase free ou 2) Reprendre l'analyse depuis l'extraction.

Notes :



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

