

SOLUS ONE SALMONELLA

Système de test immunologique
pour la détection de la *Salmonella*
dans aliments sélectionnés

Numéro du supplément : 39
Numéro de publication : 1,0
Date de publication : Janvier 2020
Code(s) de produit : SAL1-0096; SAL1-0480
Organisme de certification : AFNOR





SOL 37/04-12/18
AUTRES MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'AGRO-
INDUSTRIE
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Cette méthode est certifiée par la certification AFNOR pour la détection de la *Salmonella* dans les catégories suivantes : prêt-à-manger, prêt-à-réchauffer (à l'exclusion des produits fumés), lait et produits laitiers transformés à la chaleur, et produits à base d'œufs (réf. de validation **SOL 37/04-12/18**).

1. INTRODUCTION

Le test Solus One *Salmonella* fournit un résultat négatif ou présumé positif à partir d'une seule étape d'enrichissement en 24 heures, durée du test comprise.

2. UTILISATION PRÉVUE

Le test Solus One *Salmonella* destiné à la détection le jour suivant des espèces de *Salmonella* dans certains aliments. La méthode de test est facile à réaliser mais elle nécessite des installations de laboratoire ainsi qu'un personnel qualifié et formé. Une formation de base est recommandée aux utilisateurs débutants. Elle est fournie par Solus Scientific Solutions Ltd.

L'utilisation de cette méthode inclut la conformité aux bonnes pratiques de laboratoire (voir ISO 7218).

3. RÉACTIFS FOURNIS

Composant	Apparence	Volume		Commentaires
		SAL1-0096	SAL1-0480	
Plaque de test	Microplaque à 96 puits au format barrette amovible/cassable	1	5	Puits revêtus d'anticorps contre les espèces de <i>Salmonella</i>
Contrôle négatif	Liquide orange pâle. Étiquette verte.	3 ml	10ml	Concentration de travail. Contient Un diluant avec conservateur.
Contrôle positif	Liquide noir. Étiquette rouge.	3 ml	10ml	Concentration de travail. Contient de la <i>Salmonella</i> inactivée par la chaleur dans un diluant avec conservateur.
Conjugué	Liquide incolore/très pâle de couleur paille. Étiquette orange.	11ml	60ml	Concentration de travail. Contient un anticorps conjugué contre la peroxydase de raifort dans un diluant avec conservateur.
Substrat	Liquide incolore/bleu très pâle. Étiquette bleue.	11ml	60ml	Concentration de travail. Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), du peroxyde d'hydrogène et des stabilisateurs.
Solution d'arrêt	Liquide incolore. Étiquette argentée.	11ml	60ml	Concentration de travail. Contient de l'acide sulfurique 0,2M.
Concentré de tampon de lavage	Liquide incolore/jaune/orange. Étiquette blanche.	10ml x 6	60ml x 5	Concentré. À diluer avant utilisation.
Concentré de tampon de lavage	Sachet en aluminium contenant une poudre blanche granuleuse.	6 (petit)	5 (grand)	L'activateur du tampon de lavage doit être dissous dans le volume requis d'eau déionisée (DI) avant d'ajouter le concentré du tampon de lavage à la solution. Voir la section 5,1 pour plus de détails.
Filtres en verre fritté	Disques plats en plastique blanc ~12 mm de diamètre	100	500	Des filtres en verre fritté doivent être appliqués sur chaque tube d'échantillon après le traitement thermique après refroidissement de l'échantillon à température ambiante (18-25°C). Voir

				la section 7 pour plus de détails.
--	--	--	--	------------------------------------

La plupart des composants du kit sont fournis stabilisés et prêts à l'emploi à la concentration de travail seuls l'activateur de tampon de lavage et le concentré de tampon de lavage nécessitant une dilution. Chaque kit contient suffisamment de matériel pour 1 détermination (SAL1-0096) ou 5 déterminations (SAL1-0480) x 93, plus les contrôles. La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette de chaque produit.

4. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRE QUI NE SONT PAS FOURNIS

Réfrigérateur entre 2 et 8 °C.	Mélangeur de type vortex
Eau déionisée ou distillée (DI)	Minuteur
Eau peptonée tamponnée (EPT)	Incubateur à 37±1°C.
Supplément Solus One	Incubateur à 41,5±1°C.
70 % v:v éthanol	Tubes pour l'ébullition des échantillons (par ex. tubes sans col en polypropylène de 5ml - 12x75 mm)
Éprouvettes graduées pour différents volumes (par ex. 250ml, 1 l)	Appareil de chauffage (par exemple, bloc de chauffage) capable de chauffer à 85-100°C.
Sachets filtrants	Pipettes et pointes (1ml ; 0,1ml)
Homogénéisateur (ou appareil similaire)	Laveur et lecteur de microplaques DyneX DS2 ou Microplate avec filtre 450 nm
Pipettes de transfert de 3ml (stériles)	Autoclave pour la décontamination des échantillons

5. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

5.1 Tampon de lavage :

Préparer les éléments suivants dans un récipient propre.

SAL1-0096	SAL1-0480
Ajouter le contenu de 1 sachet d'activateur de tampon de lavage à 240ml d'eau déionisée. Mélanger jusqu'à ce que l'activateur soit complètement dissous.	Ajouter le contenu de 1 sachet d'activateur de tampon de lavage à 1440ml d'eau déionisée. Mélanger jusqu'à ce que l'activateur soit complètement dissous.
Ajouter 10ml (1 flacon) de concentré de tampon de lavage au récipient contenant la solution d'activateur et agiter pour mélanger.	Ajouter 60ml (1 flacon) de concentré de tampon de lavage au récipient contenant la solution d'activateur et agiter pour mélanger.

5.2 Bouillon de culture (milieu de croissance) :

- Préparer l'eau peptonée tamponnée (EPT) en suivant les consignes du fabricant. Le laisser refroidir à la température ambiante (18-25°C) avant de l'utiliser pour les tests.
- Reconstituer le supplément Solus One conformément aux consignes du fabricant. Préparer le supplément d'enrichissement EPT correspondant à la taille de l'emballage utilisé.

SALSUPP22.5; SALSUPP112.5	SALSUPP200
Ajouter 4,44ml de supplément pour 1 l d'EPT	Ajouter 2,5ml de supplément pour 1 l d'EPT

6. PRÉPARATION ET ENRICHISSEMENT DES ÉCHANTILLONS

6.1 Méthode standard

- Homogénéiser 25 g de l'échantillon d'essai dans 225ml d'EPT enrichi et laisser incuber pendant 20-22 heures à $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Certains types d'échantillons enrichis peuvent contenir des particules qui rendent le pipetage difficile. Nous vous recommandons d'utiliser des sachets filtrants pour l'enrichissement afin de contenir les particules et de réduire les problèmes de pipetage.

Dans le contexte de la VALIDATION NF, les portions de plus de 25 g n'ont pas été testées. Se référer à la norme EN ISO 6579 relativement aux préparations spécifiques de la suspension mère pour certains aliments.

S'assurer que le temps de traitement des échantillons sur paillasse soit maintenu au minimum et que le transfert dans l'incubateur à $41,5^\circ\text{C}$ se produise dès que possible. Ceci est important pour éviter une croissance importante des organismes concurrents.

7. INACTIVATION THERMIQUE APRÈS ENRICHISSEMENT

- 7.1. Lorsque la période d'incubation de l'échantillon est terminée, transférer une aliquote de 1-2ml (en évitant les particules) dans un tube à essai pour l'ébullition (par ex. un tube de 5ml en polypropylène).
- 7.2. Chauffer l'aliquote à $85-100^\circ\text{C}$ pendant 15-20 minutes dans le tube. Après le chauffage, laisser refroidir l'échantillon à température ambiante ($18-25^\circ\text{C}$). Cette opération peut être accélérée en plaçant les tubes dans de l'eau du robinet froide pendant environ 5 minutes.
- 7.3. Pour éviter les problèmes de pipetage, en particulier sur l'appareil Dynex DS2, ajouter un filtre en verre fritté directement dans chaque tube d'échantillon et appuyer doucement pour permettre le pipetage d'un échantillon relativement clair au-dessus du niveau du verre fritté.

REMARQUE - le verre fritté ne doit être inséré qu'après la phase de chauffage et une fois que le tube a refroidi à température ambiante ($18-25^\circ\text{C}$).

Certains types d'échantillons peuvent coaguler pendant l'étape d'inactivation thermique, ce qui peut entraîner des difficultés de pipetage des échantillons. Les produits à base d'oeufs et les caséinates sont des exemples de ces types d'échantillons. Ces échantillons peuvent nécessiter un ajout manuel au dosage immunologique.

Les échantillons qui n'ont pas été inactivés par la chaleur doivent être conservés à des fins de vérification jusqu'à ce que les résultats des immunodosages aient été obtenus. Ces échantillons doivent être conservés à $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ si l'immunodosage doit être effectué dans les 2 heures. Si cela n'est pas possible, conserver les bouillons pendant 72 heures maximum à $2-8^\circ\text{C}$ avant l'immunodosage.

8. PROCÉDURE D'IMMUNODOSAGE

- 8.1. Sortir le kit de test de son lieu de conservation au moins une heure avant utilisation pour permettre aux composants d'atteindre la température ambiante ($18-25^\circ\text{C}$). Déterminer le nombre de puits requis pour le test. Retirer le nombre de barrettes requis de la pochette et les fixer au cadre fourni. Les barrettes inutilisées doivent être remises dans la pochette et conservées entre 2 et 8°C .

- 8.2. Préparer le tampon de lavage comme indiqué dans la section 5.1 en fonction de la taille du kit utilisé.
- 8.3. Laisser le premier puits de la barrette vide pour servir de « blanc » afin de mesurer l'absorbance du substrat.
- 8.4. Pipeter 0,1ml de contrôle négatif (étiquette verte) dans le deuxième puits.
- 8.5. Pipeter 0,1ml de contrôle positif (étiquette rouge) dans le troisième puits.
- 8.6. Pipeter 0,1ml de chaque échantillon inactivé par la chaleur séparément dans des puits consécutifs de la barrette. S'il reste des puits à la fin d'une barrette de test, les contrôles positifs ou négatifs peuvent être répétés. †
- 8.7. Incuber la plaque (contenant les barrettes) à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 30-35 minutes.
- 8.8. Après incubation, aspirer le contenu des puits, en éliminant autant de liquide que possible. Laver les puits 5 fois avec le tampon de lavage en veillant à remplir et à vider complètement les puits à chaque cycle de lavage. La technique de lavage est essentielle pour les performances de dosage. Il est donc recommandé d'utiliser un laveur de microplaques.
- 8.9. Pipeter 0,1ml de conjugué (étiquette orange) dans tous les puits, à l'exception du puits « vide ».
- 8.10. Incuber la plaque à $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 30-35 minutes.
- 8.11. Répéter les cycles de lavage comme indiqué à la section 8.8
- 8.12. Pipeter 0,1ml de conjugué (étiquette bleue) dans tous les puits, à l'exception du puits « vide ».
- 8.13. Incuber la plaque à température ambiante ($18-25^{\circ}\text{C}$) pendant 30 minutes, dans l'obscurité.
- 8.14. Après incubation, arrêter la réaction en ajoutant 0,1ml de solution d'arrêt (étiquette argentée) à tous les puits, y compris le puits « vide ». Les puits contenant du bleu deviendront jaunes après l'ajout de la solution d'arrêt.
- 8.15. Lire les densités optiques des puits dans les 10 minutes dans un lecteur de plaques à l'aide d'un filtre 450 nm. Avant la lecture, vérifier qu'il n'y ait pas de bulles d'air dans les puits et, le cas échéant, les faire éclater avec une aiguille. Le lecteur doit être remis à zéro par rapport au puits « vide » bien avant la lecture des autres puits. Ne pas utiliser de filtre de référence. L'utilisation d'un équipement ELISA automatique est préférable. Il doit être configuré et validé selon ce protocole.

† En cas d'utilisation de l'instrumentation Dynex, veiller à éviter la formation de bulles dans les tubes contenant les échantillons et le réactif ou la formation de films dans les tubes, au-dessus du niveau du liquide. Il est essentiel de vérifier que le système ait bien pipeté les échantillons dans la plaque de dosage avant de procéder plus avant.

9. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés sous forme de mesures de densité optique (DO_{450}) à l'aide d'un lecteur de microplaques.

Critères d'acceptation :

DO du contrôle négatif ₄₅₀	< 0,100
DO du contrôle positif ₄₅₀	> 0,500

La valeur du puits vide (généralement A1 lors d'un traitement manuel) doit toujours être soustraite. Si la valeur des contrôles négatifs ou positifs ne répond pas à ces critères, le test n'est pas considéré comme valide et doit être effectué à nouveau.

Les échantillons dont les relevés de DO₄₅₀ sont < 0,200 sont considérés comme négatifs. Dans ce cas, l'analyse est terminée, les résultats peuvent être rapportés et les échantillons correspondants qui n'ont pas été inactivés par la chaleur peuvent être éliminés conformément aux réglementations/directives locales.

Les puits d'échantillonnage avec une DO₄₅₀ ≥ 0,200 sont présumés positifs pour la *Salmonella*. Les résultats présumés positifs doivent être vérifiés à l'aide d'une méthode de culture reconnue.

10. CONFIRMATION DES RÉSULTATS POSITIFS DES IMMUNODOSAGES DE SALMONELLA

Dans le contexte de LA VALIDATION NF, tous les échantillons identifiés comme positifs par la méthode alternative doivent être confirmés par l'un des tests suivants :

- En utilisant les tests conventionnels décrits dans les méthodes standardisées du CEN ou de l'ISO. L'étape de confirmation doit commencer à partir de l'échantillon d'EPT enrichi non-inactivé par la chaleur conservé à 41,5 °C ou 2-8 °C. Placer l'échantillon d'EPT enrichi (10 µl) sur une plaque de gélose (XLD ou une gélose chromogène pour *Salmonella* telle que Colorex *Salmonella* de CHROMagar). Incuber les géloses conformément aux protocoles de culture standard de la *Salmonella*, puis effectuer des tests de confirmation : test d'agglutination au latex F42 de Microgen ou galerie d'identification biochimique.
- Ou mettre l'échantillon non-inactivé par la chaleur (0,1ml + 10ml) en culture dans un bouillon RVS et incuber pendant 21 à 27 h à 41,5 °C ± 1 °C. Ensemencer sur XLD ou sur une gélose chromogène pour *Salmonella* telle que Colorex *Salmonella* de CHROMagar). Incuber la gélose conformément aux protocoles de culture standard de *Salmonella*, puis effectuer des tests de confirmation, par exemple le test au latex F42 de Microgen ou la galerie d'identification biochimique, directement sur des colonies isolées sans étape de purification ou en effectuant les tests décrits dans les méthodes normalisées (CEN ou ISO).

NOTE : Le test au latex F42 utilise des anticorps polyclonaux pour détecter les antigènes de flagelles, il n'est pas adapté à la détection de la *Salmonella* non motile. Il est possible d'effectuer des tests de confirmation directement si les colonies sont bien isolées.

En cas de résultats discordants (résultat ELISA présumé positif non confirmé par l'un des moyens décrits ci-dessus et en particulier en ce qui concerne les tests au latex), le laboratoire doit suivre les étapes nécessaires pour assurer la validité du résultat obtenu.

11. CONSERVATION ET EXPIRATION DU KIT

Le kit et tous les composants inutilisés doivent être conservés entre 2 et 8 °C. NE PAS CONGELER. La date d'expiration du kit est indiquée sur la boîte, ainsi que sur tous les composants du kit contenus dans celle-ci. Tout tampon de lavage dilué non utilisé peut être conservé pendant 10 jours maximum entre 2 et 8 °C. Toutes les barrettes de microplaques inutilisées doivent être remises dans la pochette en aluminium avec le sachet de dessiccant en veillant à bien la refermée et en la conservant entre 2 et 8 °C.

12. SÉCURITÉ

Bien que les procédures détaillées soient simples et faciles à réaliser, elles nécessitent des installations de laboratoire dotées d'un personnel formé à la manipulation d'organismes potentiellement pathogènes.

- La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique corrosif. Laver immédiatement avec de grandes quantités d'eau si la solution entre en contact avec la peau ou les muqueuses.
À titre indicatif, les précautions minimum suivantes doivent être prises :

- Des vêtements de protection doivent être portés, notamment une blouse de laboratoire, des lunettes de sécurité, un masque et des gants, le cas échéant.
- Ne pas pipeter en utilisant la bouche.
- Éviter tout contact avec la peau.
- Ne pas manger, boire ou appliquer de cosmétiques dans le laboratoire.
- Respecter toutes les réglementations locales, provinciales et/ou nationales applicables en matière d'élimination des déchets biologiques.

13. PRÉCAUTIONS

- Les réactifs sont fournis à une concentration de travail fixe. La sensibilité et la spécificité optimales seront réduites si les réactifs sont modifiés ou ne sont pas conservés dans les conditions recommandées.
- Ne pas mélanger différents lots de réactifs.
- Éviter la contamination microbienne des flacons de réactif ouverts.
- S'assurer qu'aucune contamination croisée ne se produise entre les puits.
- Il est essentiel au bon déroulement du test que l'anticorps conjugué aux enzymes ne puisse pas contaminer les autres réactifs et équipements.
- S'assurer que les composants du kit ne soient pas exposés à des températures supérieures à 40 °C.
- Les solutions contenant de l'azoture de sodium ne doivent pas être utilisées pour nettoyer les équipements, en particulier les dispositifs de lavage (l'enzyme peroxydase utilisée dans le kit est inactivée par l'azoture de sodium).
- Ne pas utiliser à des fins de diagnostic d'échantillons médicaux.

14. INFORMATIONS DES FDS

Des fiches de données de sécurité (FDS) relatives à ce test sont disponibles sur demande.

GARANTIE

La précision des résultats dépend de l'utilisation correcte du kit en suivant attentivement les consignes d'utilisation. Si le kit ne fonctionne pas conformément aux spécifications, veuillez contacter :

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcenter, Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire, NG19 7JZ.

Tél. - +44 (0)1623 429701

E-mail : info@solusscientific.com

Informations sur les droits d'auteur

Le présent document, y compris toutes ses photographies et illustrations, contient des informations propriétaires protégées par le droit d'auteur. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite sous quelque forme que ce soit niu traduite dans une langue quelconque sans l'autorisation écrite préalable de PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Tous droits réservés.

Marques commerciales

PerkinElmer est une marque déposée de PerkinElmer, Inc. Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Résumé des modifications

Date de la modification	Numéro de publication :	Résumé des modifications
Jan2020	1	Nouvelle marque et combinaison de Solus One Salmonella – Supplément 28 – Numéro 1,1 – 09/19 et Solus One Salmonella – Supplément 21 – Numéro 1.2 – 12/18 dans un seul document.

NOTE : Les modifications mineures (par exemple, formatage, grammaire, correction d'erreurs typographiques) ne sont pas incluses dans le résumé des modifications.

Pour plus d'informations, veuillez cons le site www.solusscientific.com

Fabriqué à :

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre,
Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire
NG19 7JZ
Royaume-Uni
Tél. - +44 (0)1623 429701

PerkinElmer, Inc

940 Winter Street,
Waltham, MAa 02451
États-Unis T : (800) 762-
4000 ou
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Pour voir lae liste complète de nos bureaux mondiaux, veuillez consulter nous consulter la page www.perkinelmer.com/ContactUs