



NOTICE TECHNIQUE (Version 3.1)

Kit d'amplification

ADNucleis Giardia intestinalis TQM®

-

Diagnostic du pathogène Giardia intestinalis

par la Réaction de Polymérase en Chaîne en temps réel [QPCR] grâce à la technologie TQM®

ref :HQS_Giardia-tqm

ADNUCLEIS SAS

Siret 497 802 165 000 17
TVA intraCEE : FR 3649780216500017

3 Route des Pierres Blanches
F-69290 GREZIEU LA VARENNE

support@adnucleis.com

TEL : + 33 (0) 972 621 107

FAX : + 33 (0) 959 448 563

Table des matières

I. Données administratives	2
I.1 Nom du produit	2
I.2 Description du produit	2
I.3 Généralités	2
I.4 Fabricant	3
II. Présentation du kit d'amplification	3
II.1 Principe de la détection	3
II.2 Description et contenu du kit	3
III. Préparation de l'échantillon	4
III.1 Matériel	4
III.2 Utilisation du milieu de croissance recommandé	4
III.3 Utilisation d'un milieu de croissance autre que celui recommandé par ADNucleis	4
III.4 Additifs	4
III.5 Méthode	5
III.5.a. Enrichissement	5
III.5.b Concentration	5
IV. Conservation des réactifs d'amplification	5
V. Préparation de l'amplification	5
V.1 Précautions	5
V.2 Matériel	6
V.3 Extraction des acides nucléiques	6
V.4 Réalisation de la qPCR	7
V.5 Protocole de PCR	7
V.6 Validation de l'analyse	7
VI. Schéma de levée des inhibitions	8
VII. Métrologie	8
VIII. Recommandations et résolution des problèmes	9
VIII.1 Procédure de décontamination	9
VIII.2 Compatibilité des plastiques	9
IX. Bibliographie	9

I. Données administratives

I.1 Nom du produit

ADNucleis Giardia intestinalis TQM®-

I.2 Description du produit

Le gène visé est l'ARN 16S

Le kit utilise la technologie de fluorescence TQM®

Un témoin d'inhibition (interne ou externe) permet de déterminer le statut d'inhibition ou non de la réaction pour l'échantillon testé.

Les échantillons biologiques validés sont sur matrice(s): Eau de boisson, eau de baignade, matrices alimentaires

Le kit (Réaction de Polymérase en Chaîne en temps réel [QPCR]) permet la détection spécifique du (de l') espèce *Giardia intestinalis* pour un échantillon.

La ou les cibles détectées par le kit sont les suivantes :

Giardia intestinalis

I.3 Généralités

Le parasite *Giardia* sp. est l'un des parasites intestinaux les plus communs chez l'homme: environ 200 millions de personnes infectées en Asie, Afrique et Amérique Latine [1]. Une fois infecté, le parasite *Giardia* cause généralement une giardiose caractérisée par une diarrhée, des crampes abdominales, des ballonnements, une perte de poids and une malabsorption des aliments consommés.

Cependant, les giardioses asymptomatiques sont fréquentes, surtout dans les pays en développement [2, 3].

Giardia est également un parasite entérique très commun des animaux domestiques, du bétail [4, 5], et d'animaux sauvages [6]. Une seule espèce est décrite dans ce genre: *Giardia duodenalis* et cause la maladie chez l'homme et la plupart des mammifères. La giardiose est ainsi considérée comme un zoonose.

I.4 Fabricant

ADNUCLEIS SAS
3 Route des Pierres Blanches
69290 GREZIEU LA VARENNE - France
contact@adnucleis.com
Tel: + 33 (0) 972 621 113
Fax: + 33 (0) 959 448 563
Bureaux ouverts du Lundi au Vendredi, de 9h à 18h.

II. Présentation du kit d'amplification

II.1 Principe de la détection

Le test ADNucleis Giardia intestinalis TQM® est un test d'amplification des acides nucléiques de Giardia intestinalis. Ce kit possède un contrôle d'inhibition interne permettant de détecter la présence d'inhibiteurs de PCR en trop grande quantité. Le test est réalisé à partir des acides nucléiques extraits de l'échantillon. La fluorescence mesurée en temps-réel est soit due à la libération d'un fluorophore dû à la dégradation de la sonde pour la chimie Taqman® ou à l'intercalation d'un agent fluorescent dans les amplicons synthétisés pour la chimie Sybr®. Le niveau de fluorescence est relatif à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

II.2 Description et contenu du kit

Le kit de PCR en temps réel ADNucleis Giardia intestinalis TQM® est prêt à l'emploi pour la détection spécifique de Giardia intestinalis. Le kit contient les réactifs et l'enzyme(s) nécessaires à l'amplification de l'acide nucléique de Giardia intestinalis (cf. Tableau 1). La fluorescence est émise et mesurée par le système optique au cours de la PCR (cf. Tableau 2).

Tableau 1: Composition du kit Giardia intestinalis

Composants du kit manuel		48 réactions	96 réactions	Reconstitution
Pré-mix PCR Giardia intestinalis		1100 µl	1850 µl	Prêt à l'emploi
Enzyme: <i>Taq</i> Nucleis		116 µl	232 µl	Prêt à l'emploi
0		195 µl	395 µl	Prêt à l'emploi
Contrôle positif : CP- <i>Alicyclobacillus</i>		300 µl	300 µl	Prêt à l'emploi
Contrôle négatif : CN (tampon d'éluion) option		1.8 ml	1.8 ml	Prêt à l'emploi

Tableau 2: Filtres de détection pour le kit Giardia intestinalis

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
<i>Giardia intestinalis</i>	FAM	495 nm	515 nm
0	VIC	530 nm	550 nm

Matériel nécessaire non fourni :

- Hotte biologique
- Appareil de RT-PCR
- Centrifugeuse
- Vortex

- Plaques/Tubes pour réaction de RT-PCR
- Micropipettes
- Cônes stériles à filtre pour micropipettes
- Microtubes stériles
- Gants

III. Préparation de l'échantillon

III.1 Matériel

- Milieu de culture non applicable
- Etuve stabilisée à -
- Tubes à essai ou tubes type Falcon 15 ml.
- Tubes de 1,5mL stériles.

III.2 Utilisation du milieu de croissance recommandé

- Pas de milieux recommandé par ADNUCLEIS

III.3 Utilisation d'un milieu de croissance autre que celui recommandé par ADNUCLEIS

- Suivre les instructions du fabricant pour le reconstituer et l'utiliser.

III.4 Additifs

- Pour le kit Giardia intestinalis, le supplément antibiotique est: non nécessaire

L'additif SE est non nécessaire pour l'enrichissement de Giardia intestinalis

III.5 Méthode

III.5.a. Enrichissement

-

Les protocoles de détection sont sensibles aux conditions d'incubation. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les conditions de température indiquées. Notamment, il convient de s'assurer que les conditions de préchauffage du bouillon d'enrichissement permettent d'atteindre la température indiquée. La durée de préparation de l'échantillon, délai entre la fin de l'étape de préchauffage du bouillon d'enrichissement et le début de la phase d'incubation de l'échantillon alimentaire, ne doit pas excéder 45 minutes. L'utilisation d'une étuve ventilée pour la phase d'incubation est recommandée.)

III.5.b Concentration

Prenez 1 ml d'échantillon et centrifugez pendant 5 min à 10000 tr / min.

Jeter totalement le surnageant.

Remettre en suspension dans 100 ul de tampon D et incuber pendant 10 min à 70 ° C.

IV. Conservation des réactifs d'amplification

Tous les réactifs d'amplification, à réception, doivent être stockés à -20°C. Après décongélation, les réactifs d'amplification non reconstitués peuvent être recongelés. Ne pas excéder 5 décongélation. Tous les réactifs d'amplification non décongelés peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur le kit.

Les réactifs sont à conserver suivant le tableau ci-dessous:

	A réception Température/ durée	Après 1er utilisation et/ ou décongélation	Remarques
Prémix, enzymes, témoin positif, IPC	-20 +/-3 °C 6 mois pour la détection des ADN 3 mois pour la détection des ARN	le prémix non reconstitué peut être recongelé/décongelé 5 fois maximum	Uniquement pour les kits non reconstitués

Dès que l'(les) enzyme(s) est (sont) ajoutée(s) au prémix d'amplification, le mix d'amplification reconstitué doit être utilisé dans les 30 min. Le reste de mix d'amplification reconstitué non utilisé doit être jeté.

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.

V. Préparation de l'amplification

V.1 Précautions

Les volumes d'ADN à transférer dans les tubes d'amplification sont faibles, il est recommandé d'utiliser des micropipettes ayant une métrologie régulière. Un apport en excès (+50%), d'échantillon dans la solution d'extraction, ou du surnageant d'extraction dans le réactif d'amplification, peut inhiber les réactions.

Il est conseillé d'utiliser un bloc froid qui change de couleur en fonction de sa température. Si, au cours du dépôt d'ADN, la couleur du bloc indique que la température du bloc est trop haute, remettre le bloc avec les tubes PCR dans un congélateur (-20°C), le temps qu'il redescende en température, puis poursuivre le dépôt d'ADN.

Vérifier que l'ADN et le mix réactionnel est bien au fond du tube, tapoter ou centrifuger le cas échéant.

Vérifier la présence du réactif avant utilisation

Ne pas toucher les capuchons optiques à mains nues, ne pas rayer les capuchons optiques.

Ne pas pipeter avec la bouche.

Il est recommandé d'utiliser les pipettes entre 35% et 100% de leur volume d'utilisation.

Il est conseillé de tourner 1/3 de tour au-delà du volume désiré puis de retourner la molette dans l'autre sens pour atteindre le volume souhaité (ceci de même en ce qui concerne le volume maximal de la pipette) afin que le ressort de la pipette soit en bonne position.

Lors du pipetage, traverser seulement la surface du liquide de 1 à 6 mm et maintenir la pipette vertical.

Il est recommandé d'appliquer une vitesse uniforme et lente lors du prélèvement et du dépôt du liquide.

Distribution sur le côté du puits car les volumes sont petits.

Le pré-rinçage des consommables (2-3 allers-retours) est recommandé afin d'humidifier les cônes avant prélèvement.

Un rythme constant de pipetage, de pression sur le bouton presseur et une vitesse constante permettent de pipeter de façon uniforme.

La chaleur transmise par la main a un impact sur l'uniformité des pipetages. Il est recommandé de poser la pipette toutes les 10-15 mins sur support vertical pour reprendre la température ambiante.

Choisir le consommable le mieux adapté à la pipette.

Ne pas manger ou boire vers la zone de préparation de l'analyse.

Porter des gants non poudrés, une blouse de laboratoire, et des lunettes de protection lorsque vous manipulez des échantillons et les réactifs.

Se laver les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

Eviter la contamination microbienne et par des ribonucleases/DNase des réactifs lors du prélèvement d'aliqots dans les flacons de réactifs.

L'utilisation de pipettes et de cônes stériles est recommandée.

Ne pas mélanger les témoins provenant de différents lots ou de différents flacons du même lot.

Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents pour une même cible.

Jeter les réactifs non utilisés et les échantillons suivant les règles en vigueur dans le pays, l'état et la région concernés.

Les fiches de sécurité des réactifs (MSDS) sont disponibles sur demande auprès d'ADNUCLEIS.

Les échantillons et les témoins doivent être manipulés en les considérant comme potentiellement infectieux. Il est recommandé de suivre les règles de laboratoire explicitées dans « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories and in the CLSI Document M29 ».

Nettoyer et désinfecter les surfaces avec une solution de sodium hypochlorite 0.5% préparée extemporanément.

L'eau de javel commerciale est généralement une solution à une concentration de 5.25%. Une dilution au 1/10 avec de l'eau déionisée permet d'avoir une solution à 0.5%.

Les réactifs d'extraction et de purification ADNUCLEIS peuvent contenir du guanidine thiocyanate. Lorsque ces réactifs sont jetés, éviter le contact avec le sodium hypochlorite. Le mélange peut produire des gaz hautement toxiques.

S'assurer que la température des pièces n'excède pas 25°C. Lors de l'utilisation de master mix, décongeler les master

Garder les tubes PCR sur un bloc froid ou dans la glace lors de l'aliqotage et aussi lors du dépôt des ADN dans les tubes PCR contenant le master mix.

V.2 Matériel

- Micropipettes
- Cônes avec filtres
- Gants; changer de gants avant de commencer l'amplification

V.3 Extraction des acides nucléiques

L'utilisation des kits d'extraction/purification FOOD Adnucleis est recommandée. Ces kits permettent l'extraction/purification d'acides nucléiques à partir de diverses matrices alimentaires et de l'environnement de production. L'utilisation d'autres kits d'extraction peut impacter les résultats d'amplification.

V.4 Réalisation de la qPCR

Remarque générale : le contrôle positif contient une concentration élevée d'ADN cible. Les manipulations doivent être réalisées avec précaution pour éviter toute contamination.

Il est nécessaire de tester le contrôle positif CP-Giardia intestinalis (12 µl par réaction de PCR), ainsi qu'un contrôle négatif. Si le premix n'inclus pas un IPC, il est nécessaire de prévoir un puits avec le mix et l'ADN d'échantillon pour le contrôle EPC.

V.5 Protocole de PCR

Décongeler lentement les composants du kit sur glace. S'assurer avant toute manipulation que tout le premix est décongelé.

Homogénéiser les tubes contenant le prémix et l'enzyme Taq Nucleis et les centrifuger brièvement.

Préparer le mélange réactionnel comme ci-dessous, N étant le nombre de réaction(s), prévoir la quantité de mélange réactionnel pour N+3 réactions minimum.

Nombre de réactions	1	N+3
Prémix PCR Giardia intestinalis	18 µl	(N+3) x 18 µl
Tampon élution	20 µl	(N+3) x 20 µl
Enzyme :Taq Nucleis	2 µl	(N+3) x 2 µl
contrôle d'inhibition interne	(3 µl)	(N+3) x 3 µl
Volume total du mélange réactionnel	40 µl (43 µl if IPC)	(N+3) x 40 µl (43 µl if IPC)

Le témoin positif de la cible est disponible séparément. Contacter Adnucleis

Distribuer 40 µl (43 µl si IPC) du mélange réactionnel à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtres stériles dans chaque tube/puits de microplaque pour PCR en temps-réel.

Pour Giardia intestinalis TQM®, ajouter

12 µl d'ADN extrait, ou

12 µl de CP-Giardia intestinalis pour le contrôle positif, ou

12 µl de tampon d'élution pour le contrôle négatif.

Pour le contrôle externe EPC : Ajouter 12 µl d'ADN extrait.

Fermer immédiatement avec un film adhésif pour éviter toute contamination.

Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.

Réaliser le programme suivant (Tableau 4) sur l'instrument de QPCR.

Tableau 4: Profil thermique de QPCR

Programme	Température	Durée	Nb de Cycles	Acquisition de fluorescence
Dénaturation	95°C	5 min	1	
Amplification	95°C	10 sec	42	FAM /VIC /- /-
	60°C	40 sec		
Dissociation (only for Sybr technology)	75°C à 95°C	10 min	1	FAM /VIC /- /-

ATTENTION: Ne jamais ouvrir les puits d'amplification après les cycles PCR.

V.6 Validation de l'analyse

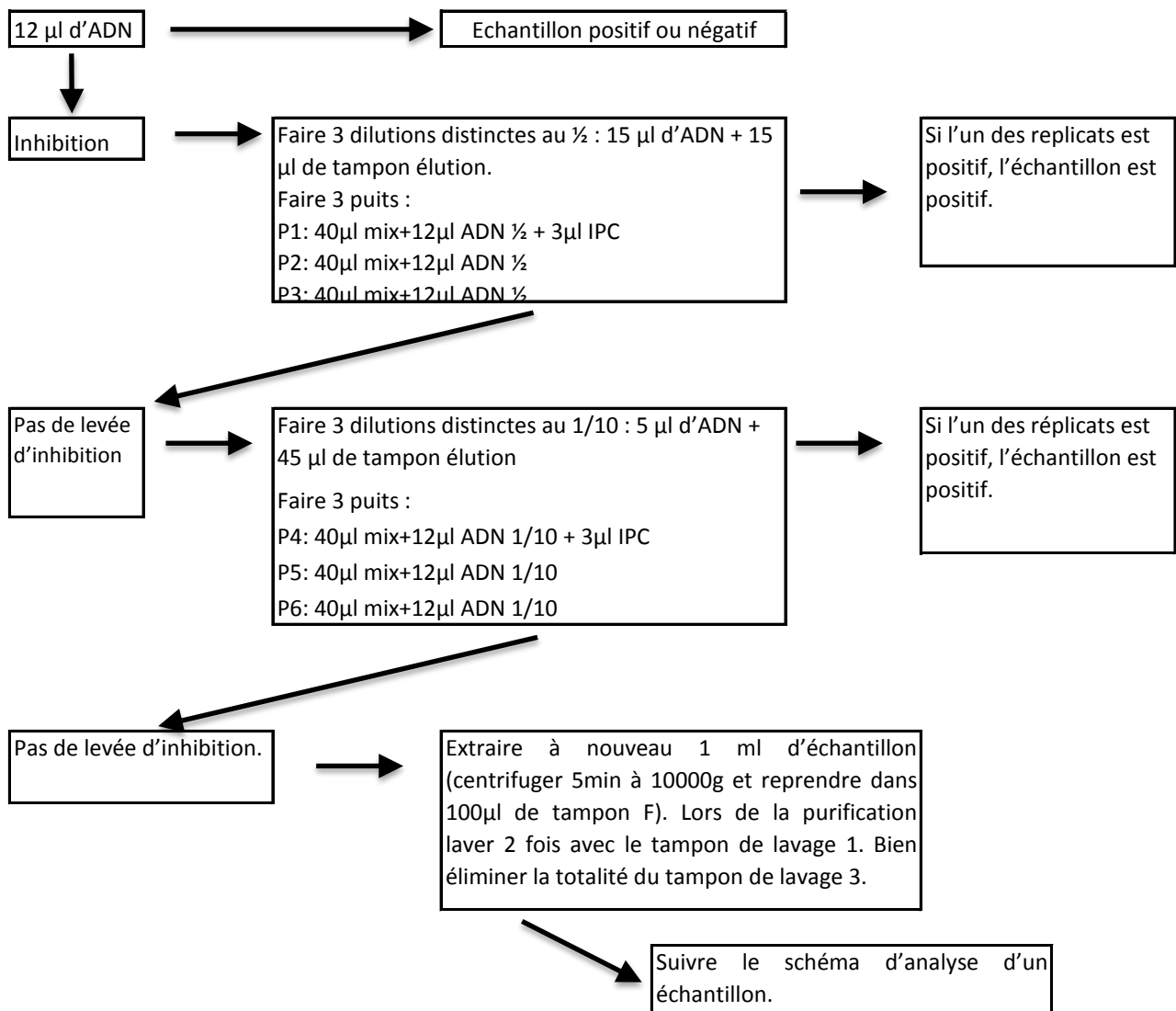
Pour que le dosage soit valide, les valeurs de Ct pour les contrôles doivent être les suivantes (Tableau 5). En dehors de ces valeurs, l'analyse ne peut être validée.

Tableau 5: Validation de l'analyse

Contrôles	Ct	Tm
CP-Giardia intestinalis (Contrôle Positif)	Ct < 38	pas de Tm
samedi 0 janvier 1900	Ct < 35	pas de Tm
CN (Contrôle négatif)	Ct > 38	pas de Tm

VI. Schéma de levée des inhibitions

On entend par inhibition l'absence de signal de l'IPC ou de l'EPC combinée à l'absence de signal de la cible.



VII. Métrologie

Les appareils et pipettes utilisés doivent être contrôlés. Concernant les plateformes PCR en temps-réel, un contrôle thermique du bloc Peltier doit être réalisé lors de la première utilisation des kits de détection ADNucleis. Ce contrôle permet de mettre en évidence des variations éventuelles de température de chaque puits du bloc Peltier. La fréquence de réalisation de ce contrôle régulier sera définie par l'utilisateur.

Le contrôle du bloc Peltier consiste en un run PCR de 96 réactions (Réf : HQS_CTRL_block) selon un profil thermique déterminé. La température de chaque puits est donc contrôlée en dynamique sur une réaction standardisée. Chaque puits réactionnel doit donner un Tm (melting temperature) dans la plage de spécificité de la cible Ti (valeur

spécifiée dans le certificat de conformité).

VIII. Recommandations et résolution des problèmes

Pour toutes questions techniques, contacter ADNUCLEIS.

support@adnucleis.com ou Tél +33 9 72 62 11 07.

VIII.1 Procédure de décontamination

Laver les paillasse et les portoirs avec d'eau de javel et de l'ethanol.

Utiliser des UV pour détruire l'ADN contaminant (se référer aux recommandations du constructeur).

Contrôle PCR des surfaces de travail par échantillonnage sur écouvillon.

Les échantillons et les consommables permettant l'extraction/purification et l'amplification des acides nucléiques sont éliminés suivant les recommandations de la réglementation sur les DASRI et assimilés.

VIII.2 Compatibilité des plastiques

Vérifier que les barrettes ou les plaques PCR sont compatibles avec votre appareil PCR. Contacter ADNucleis pour obtenir des conseils.

IX. Bibliographie

- [1] Yason, J. A., and W. L. Rivera. 2007. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol. Res.* 101:681–687.
- [2] Thompson, R. C. 2000. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* 30:1259–1267.
- [3] Himsworth, C. G., S. Skinner, B. Chaban, E. Jenkins, B. A. Wagner, N. J. Harms, F. A. Leighton, R. C. Thompson, and J. E. Hill. 2010. Multiple zoonotic pathogens identified in canine feces collected from a remote Canadian indigenous community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83:338–341.
- [4] Thompson, R. C. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126:15–35
- [5] Thompson, R. C., and P. T. Monis. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 58:69–137.
- [6] Appelbee, A. J., R. C. Thompson, and M. E. Olson. 2005. *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife—current status and future needs. *Trends Parasitol.* 21:370–376.