

ADNucleis
ARCHITECT IN DIAGNOSIS

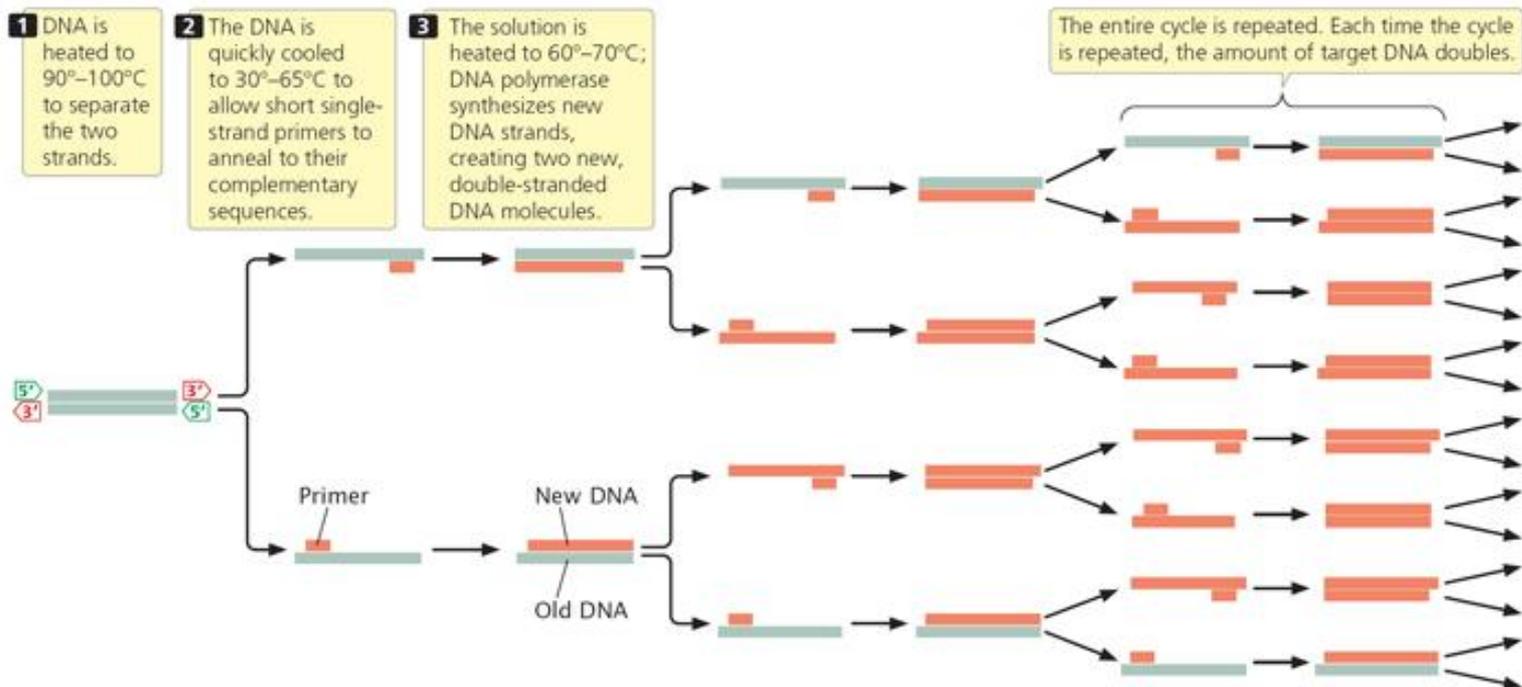


PCR
Détection
Quantification
Matériel et automates

2014

Rappel : Principe de la PCR temps réel

- Réaction enzymologique en chaîne de multiplication de brins d'ADN ciblés à partir de cycles de températures
- Chaque brin démultiplié est accompagné d'une amorce fluorescente

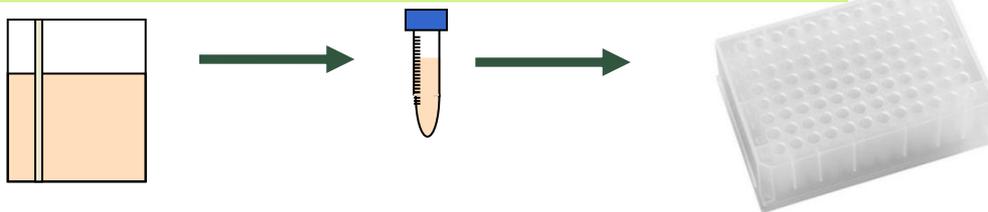


Pour quelles cibles ?

- Possibilité de détecter la présence de :
 - Pathogènes
 - Espèces animales et/ou végétales
 - Indicateurs d'hygiène
 - OGM
 - Allergènes
- Quantification si PCR sans enrichissement (notamment pour les indicateurs d'hygiène)

Process global

1. Pipetage du sac type Stomacher à la plaque 96 puits (utilisation optionnelle centrifugeuse pour *Listeria*)



2. Extraction de l'ADN (manuelle ou robotisée)

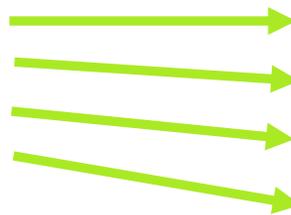


Jusqu'à 96 échantillons placés sur plaque deepwell et dont l'ADN est extrait

- En 2h30 (dont 2h de temps opérateur) sans plateforme robotique
- En 3h (dont 30 min de temps opérateur) avec plateforme robotique

3. Transfert sur plaque PCR et ajout du mix d'amplification l'ADN

4. Passage PCR, résultats en 1h30



10 min / plaque PCR

ADN extrait (élué)



Automatisation

- Réduction du temps opérateur
- Suppression du consommable (pour solution à aiguilles)
- Suppression de la gestuelle liée au procédé
- Réduction des erreurs
- Durée de fonctionnement pour une plaque (de 1h avec pipetage à cône à 3h avec pipetage à aiguille)
- Rentabilité pour les petits laboratoires
- Mise en œuvre avec crédit bail (maintenance comprise)

Aspects techniques

- A / Indicateurs d'espèces
- B / Indicateurs d'hygiène
- C / Pathogènes, allergènes et OGM non traités, mais possibilité d'étendre les travaux sur ces cibles

A /Problématique pour les indicateurs d'espèces

- La question est la suivante: Le produit analysé est-il conforme à ce qui est écrit sur l'étiquette du conditionnement ?
- Répondre à cette question implique de savoir si les produits inscrits sont bien présents, et uniquement ceux là;
- Il faut aussi pouvoir dire si un produit non inscrit sur l'étiquette a été introduit en fraude et à un taux supérieur à 0,5%
- Le séquençage répondra à la première question (sans parler ni du délai, ni du prix) mais pas à la seconde, puisque procédé non quantifiable
- La PCR répond aux deux questions; on peut rechercher éventuellement l'espèce « contaminante »; délais et prix non comparables et bcp plus faibles.

Indicateurs d'espèces pour Produits d'origine animale

- Procédé par PCR quantifiable et rapide
- Procédé pour chaque échantillon (toutes les mesures sont quantifiables par dilution de l'ADN et évaluation des Ct)
- A) cible 1: ADN total (toutes espèces animales et végétales)
- B) cible 2 : ADN viandes toutes espèces animales
- C) cible 3: ADN Viande de l'espèce annoncée par le fabricant du produit (étant entendu que la cible 3 peut être multiple)
- Si $C_3 = C_2$, à 0,5% près, pas de fraude sur les composants « viande » et si $C_2 = C_1$, à 0,5% près, pas de produits végétaux;
- mais si annonce de produits végétaux, $C_2 \neq C_1$ et proportions contrôlées par PCR

Indicateurs d'espèces pour Produits de la mer et aquaculture

- 120 espèces de poissons et entre 150 et 200 espèces si on inclut les crustacés.
- Procédé PCR avec quantification
- Cible 1: ADN total (origines animale et végétale) avec quantification
- Cible 2: ADN tous poissons avec quantification
- Cible 3 : ADN poisson annoncé par le fabricant, avec quantification
- Si 3=2, pas de contamination poisson autre que poisson indiqué; et si 2=1, pas d'ADN autre que ADN de poissons, donc le produit est conforme

Indicateurs d'espèces: les échantillons

- Présentation des produits à analyser
- A/ sous formes de pièces de viande ou de filets de poissons: mélange possible de pièces ou de filets appartenant à des espèces différentes; les échantillons seront prélevés sur les pièces ou les filets, sachant que chaque pièce ou filet ne peut appartenir qu'à une seule espèce (nb minimum: 8; optimum 16) et il ne peut y avoir ajout de protéines végétales
- B / sous formes de mélanges (viande ou poissons): dans ce cas le produit unitaire peut être un mélange appartenant à plusieurs espèces, y compris des espèces végétales (nb minimum: 8; optimum 16)

B / Indicateurs d'hygiène

- C'est l'essentiel du marché de l'analyse
- Sur produits intermédiaires, c'est de l'auto contrôle.
- Sur produits finis, quelles sont les analyses les plus demandées?
- et si analyses non certifiées, entente avec le COFRAC pour l'évaluation périodique de l'analyse

Indicateurs d'hygiène

identification

quantification

- *Escherichia coli*
- Coliformes fécaux
- Coliformes totaux
- *Pseudomonas spp*
- *Listeria spp*
- *Clostridium spp*
- anaérobies
- Levures
- *Staphylococcus coag+*
- *Legionella spp*

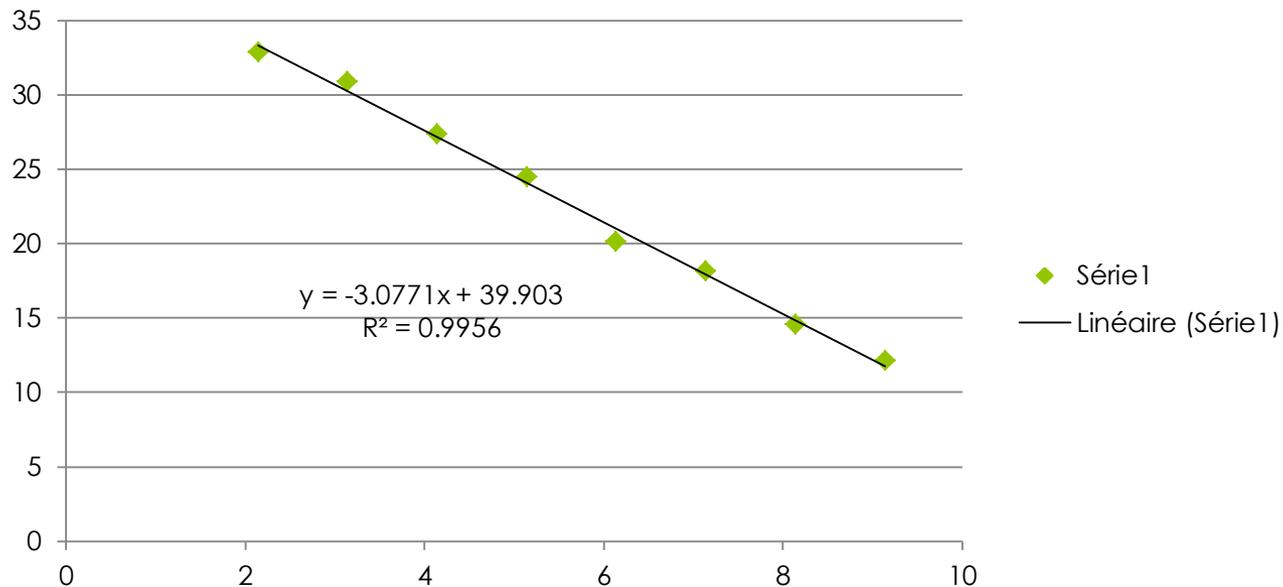
Pathogènes

présence / absence

- *Legionella pneumophila*
- *Listeria monocytogenes*
- *Clostridium botulinum*
- *Salmonella spp*
- *Cronobacter sakazakii*
- *E.coli O157H7* et autres *STEC*
- *Campylobacter*
- *Giardia spp*
- *Cryptosporidium spp*
- *Norovirus*

Quantification des indicateurs d'hygiène

- A partir des Ct du témoin positif
- Dilution de ce T pos (3 à x dilutions) pour une courbe comme ci-dessous
- Et comparaison avec les Ct de l'échantillon; analyse automatique par le logiciel pour donner le résultat



Economie pour équipement PCR / robot et fonctionnement

- ✎ Une PCR = 28K€ (maintenance 4k€/an)
- ✎ Une plateforme robotique : location bail
- ✎ Mise en place et transport PCR avec 1 journée ingénieur: 1500€
- ✎ Fonctionnement: économie de 50% du coût de fonctionnement du laboratoire avec PCR et robot

PCR Temps réel

- **Descriptif de l'appareil :**

Appareil de RT-PCR ABI 7900 amplificateur de gènes, PC, écran, logiciel SDS, programme d'aide à la décision :

Prix25.000 € HT

- **Conditions de livraison :**

Délai de Livraison : 3 semaines

- **Installation et calibration :**

Transport, Installation et démarrage par nos soins

Formation 3j par un ingénieur ADNucleis (possibilité d'extension)

Notice technique mise à votre disposition

- **Conditions de paiement :**

50% à la commande, 50% à la livraison

- **Garantie et Maintenance**

Garantie : 1 an garantie totale comprenant le déplacement

Maintenance après l'année de garantie :

Préventive :2500 €HT/an

OU

Full service (curative) pièces, main d'œuvre et déplacement compris :4500 €HT / an



PATHOGENES

Extraction	Kit extraction PVG	bulk_HQS_extract_PVG	0,70 €	96		67,20 €	
	Kit extraction Blood	bulk_HQS_extract_B	0,30 €	96		28,80 €	
	Kit extraction Eau	bulk_HQS_extract_E	0,30 €	96		28,80 €	
	Kit extraction Muscle	bulk_HQS_extract_F	0,30 €	96		28,80 €	
	Kit extraction P	bulk_HQS_extract_P	0,40 €	96		38,40 €	
Purification	Kit purification µbilles	bulk_HQS_purif_BM	1,00 €	96		96,00 €	
	Kit purification colonnes	bulk_HQS_purif_colonnes	2,00 €	96		192,00 €	
Amplification	Bulk stx1 Sybr	bulk_HQS_stx1_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	Bulk stx2 Sybr	bulk_HQS_stx2_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	Bulk eae Sybr	bulk_HQS_eae_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	Bulk Témoin inhibition	bulk_HQS_Ti_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	STEC O157H7	bulk_HQS_O157_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	STEC O26	bulk_HQS_O26_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	STEC O111	bulk_HQS_O111_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	STEC O103	bulk_HQS_O103_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	STEC O145	bulk_HQS_O145_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	Salmonelle spp Taqman	bulk_HQS_Salmonelle_Taq	1,20 €	96		115,20 €	
	Salmonelle spp Sybr	bulk_HQS_Salmonelle_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	Cronobacter sakazakii	bulk_HQS_Cronobacter_sybr	1,20 €	96		115,20 €	
	Listeria monocytogenes	bulk_HQS_Listeria_mono_Taq	2,00 €	96		192,00 €	
						- €	
		Extract Purif µbilles Amplif 1 cible au choix	bulk_HQS_E+Pbm+A 1*	2,00 €	96		192,00 €
		Extract Purif Colonnes Amplif 1 cible au choix	bulk_HQS_E+Pcol+A 1*	3,00 €	96		288,00 €

INDICATEURS D'ESPECES

Extraction + Purification	Extract F Purif BM Amplif 1 cible au choix	Extract F Purif BM Amplif 1*	1,80 €	96		172,80 €
	Extract F Purif BM	Extract F Purif BM	1,50 €	96		144,00 €
Amplification	Bulk Cheval Taq	Bulk Cheval Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Bov Taq	Bulk Bov Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Porc Taq	Bulk Porc Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Ovin Taq	Bulk Ovin Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Caprin Taq	Bulk Caprin Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Lapin Taq	Bulk Lapin Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Volailles Taq	Bulk Volailles Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Poulet Taq	Bulk Poulet Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Dinde Taq	Bulk Dinde Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Canard Taq	Bulk Canard Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk Oie Taq	Bulk Oie Taq	1,50 €	96		144,00 €
	Bulk ADN total Taq	Bulk ADN total Taq	2,00 €	96		192,00 €
	Bulk ADN toutes Viandes Taq	Bulk toutes Viandes Taq	2,00 €	96		192,00 €
	Bulk ADN Tous poissons Taq	Bulk ADN tous poissons Taq	2,00 €	96		192,00 €

INDICATEURS D'HYGIENE

Extraction	Kit extraction PVG	bulk_HQS_extract_PVG	0,70 €	96		67,20 €
	Kit extraction Blood	bulk_HQS_extract_B	0,30 €	96		28,80 €
	Kit extraction Eau	bulk_HQS_extract_E	0,30 €	96		28,80 €
	Kit extraction Muscle	bulk_HQS_extract_F	0,30 €	96		28,80 €
	Kit extraction P	bulk_HQS_extract_P	0,40 €	96		38,40 €
Purification	Kit purification µbilles	bulk_HQS_purif_BM	1,00 €	96		96,00 €
	Kit purification colonnes	bulk_HQS_purif_colonnes	2,00 €	96		192,00 €
Amplification	Enterobacteriacees	Bulk Enterobacteriacees	1,20 €	96		115,20 €
	E.coli	Bulk E.coli	1,20 €	96		115,20 €
	Listeria spp	Bulk Listeria spp	1,20 €	96		115,20 €
	Pseudomonas spp	Bulk Pseudomonas spp	1,20 €	96		115,20 €
	coliformes totaux	Bulk coliformes totaux	1,20 €	96		115,20 €
	coliformes fécaux	Bulk coliformes fécaux	1,20 €	96		115,20 €
	Legionella spp	Bulk Legionella spp	2,50 €	96		240,00 €
	Staphylococcus coag+	Bulk Staphylococcus coag+	1,50 €	96		144,00 €
	Clostridium spp	Bulk Clostridium spp	2,00 €	96		192,00 €
	Enterococcus spp	Bulk Enterococcus spp	1,50 €	96		144,00 €
	Enterococcus faecalis	Bulk Enterococcus faecalis	1,80 €	96		172,80 €
		TNT Carboglace	TNT Carbo	100,00 €	1	

Outillage

- Portoir magnétique de séparation

Prix.....650 € HT

(Inclus dans l'automate d'extraction)

- Pipette multicanaux

Prix.....700 € HT

- Bain marie à sec agitateur

Prix.....750 € HT

(Inclus dans l'automate d'extraction)

Consommables

NB : Les consommables peuvent être commandés directement chez n'importe quel fournisseur de matériel de laboratoire

Hypothèse 2000 extractions et 2000 amplifications :

	Prix Unitaire (€ HT)	Nombre	Prix total (€ HT)
Film aluminium 96 puits aluminium	0.79	20	15.80
Film X Pierce 96 puits	1.50	20	30.00
Plaque Deepwell 96 - 1ml plus	4.00	40	160.00
Plaque SBS PCR 96	1.50	20	30.00
Film SDS PCR 96	0.92	20	18.40
Cônes	0.04	16000	640.00

NB : l'hypothèse 1 extraction pour 1 amplification d'ADN surestime largement le coût car pour une extraction d'ADN par échantillon, on peut rechercher 4 à 5 cibles (amplifications)

Prix du consommable (hors kit) pour 2000 extractions (devis à préciser selon cas).....894.20 € HT

Optionnel : Automate d'extraction d'ADN

- Descriptif :

TECAN GENESIS 150, tête pipeteuse 8 canaux à aiguilles,
bras manipulateur
PC, Logiciel de commande
Bloc chauffant et homogénéisant
Programme d'extraction d'ADN
Formation 2 jours, notice, hotline

nb kits / jour	nb kits / an	prix robot/ kit
288	72000	0.63
200	50000	0.73
100	25000	1.06
50	12500	1.72
24	6000	3.16
20	5000	3.72
4	1000	17.00
2	500	17.00

L'automate est mis à disposition à l'entreprise sous forme de Location Longue Durée de 3 ans, dont le prix est révisable annuellement en fonction du nombre de kits / an (car impactant l'usure de la machine). Ce coût est compris entre 17 000 € HT et 45 000 € HT / an de manière linéaire pour un débit variant de 1 000 à 72 000 échantillons / an.

- Maintenance incluse : déplacement, pièces et main d'œuvre, curative sous 3 jours ouvrés maximum.
- Conditions de paiements : Acompte de mise en démonstration 8 jours 5000€ HT transformé en avoir si acceptation du contrat de location.
- **La prise de l'automate permet d'économiser les cônes (80% des consommables), ainsi qu'une partie de l'outillage (bain marie à sec, portoir magnétique)**

Optionnel : Automate d'extraction d'ADN



Contact

- Michel FRANCK
- Email: m.franck@adnucleis.com
- Port: + 33 (0) 660 960 141

AD NUCLEIS SAS
SAS au capital de 1 051 000 €
Siège social : 30 chemin des Mouilles - 69290 GREZIEU LA
VARENNE – France
SIRET : 497 802 165 000 17 - TVA intraCEE : FR 3649780216500017
Tel : 00 33 (0)4 78 57 16 40