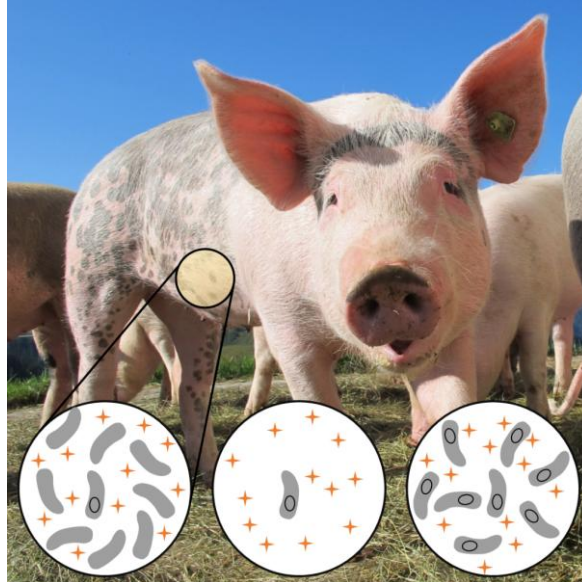


Traduction et adaptation de la notice de MINIPCR

A RECEPTION DU COLIS :



Vérifier la composition du colis indiquée ci-dessous

Stocker les articles du colis dans les bonnes conditions :

Ouvrir le carton, ⚠ Placer les éléments suivants au congélateur à - 20°C ⚠

Composition pour 48 réactions maximum :

- Mélange miniPCR EZ PCR MASTER MIX 5X, **240 µL (48 réactions)** Load-Ready™ comprenant :
La Taq polymérase
dNTP
Tampon PCR avec Mg2 +
Colorant de chargement sur gel
- PARE Primer Mix : Mix contenant les amorces : **480µL (48 réactions)**
- Template DNA : 4 échantillons d'ADN à amplifier (dont 2 témoins) **150 µL chacun, 60 réactions au total**
- 100 bp DNA Ladder, Load-Ready™ : marqueur de taille 100 pB avec bleu de charge, **110 µL**

Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en kit s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé). Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

MATERIEL ET CONSOMMABLES NECESSAIRES

Agarose 2 %

Tampon TBE 1X

Agent révélateur de l'ADN : **GELGREEN (2µL par gel)**

Thermocycleur MINIPCR ou autre marque

Cuve à électrophorèse d'ADN, idéalement BLUEGEL ou autre cuve avec transilluminateur pour une visualisation en temps réels de la migration

Micropipettes : 2-20 et 20-200 µL

1. Objectifs cognitifs

Ce kit représente une étude de cas fictive d'un problème très réel. En utilisant la PCR et l'électrophorèse sur gel, les élèves étudieront la propagation d'E. coli résistant au carbapénème dans l'environnement. Aucun échantillon environnemental potentiellement dangereux n'est utilisé dans ce kit.

2. Contexte et signification

Ce kit utilise des amorces qui simulent des tests pour le gène de résistance au carbapénème blaNDM-1. Ce kit est conçu pour initier les élèves au problème de la résistance aux antibiotiques dans l'environnement et aux techniques qui pourraient être utilisées pour surveiller le problème.

A) Résistance aux antibiotiques dans l'environnement

Les bactéries sont partout autour de nous. Elles vivent sur vous ; elles vivent à l'intérieur de vous. Elles vivent également dans le sol, dans l'eau et à peu près partout où l'on peut obtenir du carbone. Selon certaines estimations, une seule cuillère à café de sol productif contiendra environ autant de bactéries vivantes qu'il y a de personnes vivant aux États-Unis. Nous considérons normalement les bactéries comme des "germes" qui nous rendent malades, mais la grande majorité des bactéries vivant dans l'environnement seraient aussi performantes à l'intérieur de vous qu'avec le sol.

Mais nous savons tous que certaines bactéries rares nous rendent malades. Et lorsque nous en sommes malades, nous pouvons prendre un antibiotique pendant quelques jours qui nous débarrassera généralement de l'infection. Cela n'a pas toujours été le cas. L'utilisation généralisée des antibiotiques n'existe que depuis moins de 100 ans. La découverte et la caractérisation de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 est largement considérée comme l'avènement du monde moderne de la médecine antibiotique. Pour la première fois dans l'histoire de l'humanité, des infections régulièrement mortelles ont été facilement et systématiquement éliminées quelques jours après le début du traitement. En quelques décennies, plusieurs dizaines de variétés d'antibiotiques ont été introduites et mises sur le marché, et leur utilisation est considérée comme ayant permis de sauver la vie de centaines de millions de personnes.

Mais à mesure que l'utilisation des antibiotiques s'est répandue, la résistance des bactéries à ces derniers s'est accrue. Il est assez courant aujourd'hui que les infections de routine soient résistantes aux antibiotiques qui étaient autrefois utilisés pour les traiter. Et comme les bactéries deviennent résistantes à de plus en plus de médicaments différents, un avenir où les antibiotiques ne pourront plus traiter certaines infections de routine est une possibilité sérieuse à laquelle nous devons peut-être faire face tôt ou tard. En milieu hospitalier, la crainte des infections résistantes aux antibiotiques est très réelle. Les hôpitaux voient régulièrement des patients malades et les traitent avec des antibiotiques. Étant donné que de nombreuses infections sont amenées à l'hôpital et que les infections résistantes sont si difficiles à éliminer, les hôpitaux deviennent des environnements enrichis pour la résistance aux antibiotiques. En fait, les hôpitaux sont l'un des endroits où les gens sont le plus susceptibles d'être infectés par des bactéries résistantes.

Mais toutes les bactéries résistantes ne vivent pas dans les hôpitaux. De plus en plus, les bactéries résistantes aux antibiotiques se retrouvent simplement dans l'environnement, c'est-à-dire dans le sol et l'eau. Personne ne sait exactement à quel point les bactéries résistantes sont répandues dans l'environnement, mais comme il devient de

plus en plus évident que les agents pathogènes environnementaux sont une source importante d'infections chez l'homme, la crainte que nous puissions être infectés par des agents pathogènes résistants provenant de notre environnement est réelle. En 2018, environ 200 personnes dans 36 États ont été malades à cause d'une souche pathogène d'E. coli qui avait contaminé la laitue romaine ; cinq personnes en sont mortes. La source de la contamination était environnementale ; la bactérie s'était propagée par un canal d'irrigation. Heureusement, dans ce cas, la bactérie n'était pas résistante aux antibiotiques. Mais que se serait-il passé s'ils l'avaient été ?

B) D'où vient la résistance ?

La résistance aux antibiotiques est l'un des exemples les plus clairs d'évolution par sélection naturelle que l'homme ait pu observer en temps réel. En moins de 100 ans, nous sommes passés d'une résistance aux antibiotiques pratiquement inexistante à un monde où la résistance aux antibiotiques est si répandue qu'elle est considérée comme une crise sanitaire mondiale. Comment cela est-il arrivé si vite ?

Lorsque nous prenons un antibiotique, l'objectif est de tuer toutes les bactéries qui nous rendent malades. Mais souvent, les traitements ne tuent pas 100 % des bactéries. Les quelques organismes qui ont survécu après un traitement antibiotique ont probablement pu survivre parce qu'ils étaient plus résistants aux antibiotiques que tous leurs homologues qui sont morts. Si leur capacité à survivre au traitement était due à une variation génétique, lorsque ces bactéries restantes se reproduiront, elles transmettront cette résistance à leur progéniture. Lorsqu'une autre dose est prise, le cycle se répète. Avec le temps, après des traitements antibiotiques successifs, les seules bactéries qui resteront dans la population seront celles qui ont pu survivre parce qu'elles ont hérité de l'ensemble des gènes qui les rendaient résistantes. C'est pourquoi la résistance aux antibiotiques est aujourd'hui un tel problème en milieu hospitalier - toutes les bactéries non résistantes sont systématiquement éliminées. Les populations qui restent sont celles qui ont évolué pour survivre dans un monde où elles doivent régulièrement surmonter les traitements antibiotiques.

Les humains, bien sûr, ne sont pas les seuls animaux qui peuvent tomber malades à cause des bactéries. Les animaux d'élevage sont également sensibles aux infections bactériennes, et les agriculteurs traitent donc régulièrement leurs animaux avec des antibiotiques. En fait, plus de 70 % des antibiotiques importants sur le plan médical vendus aux États-Unis sont utilisés sur les animaux. Cela a conduit à certains des problèmes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement que nous connaissons aujourd'hui. Depuis longtemps, une pratique courante consiste à inclure de faibles niveaux d'antibiotiques dans les aliments pour animaux. Cette utilisation constante de faibles niveaux réduit l'incidence des infections chez les animaux d'élevage et, pour des raisons essentiellement inconnues, augmente souvent le taux de croissance des animaux. Mais l'utilisation constante de faibles doses signifie que les bactéries sont soumises à une pression sélective constante. Chaque fois que des antibiotiques sont administrés, ils tuent une grande partie, mais pas la totalité, de la population bactérienne. Les bactéries qui survivent pour se reproduire le feront parce qu'elles possèdent une résistance à l'antibiotique utilisé. Comme les mêmes antibiotiques sont utilisés dans l'alimentation, année après année, les bactéries qui sont capables de survivre peuvent le faire parce qu'elles héritent de gènes qui leur confèrent une résistance.

Bien entendu, les bactéries ne restent pas éternellement à l'intérieur des animaux. Les animaux (et les hommes) répandent constamment les bactéries qui vivent en eux, par exemple, chaque fois qu'ils toussent, éternuent et, peut-être le plus important, par les excréments. Pour l'homme, c'est souvent par ce biais que les infections bactériennes se propagent, mais le problème est largement atténué par l'utilisation de systèmes modernes d'évacuation et de

traitement des eaux usées. Pour les animaux de ferme, où il n'y a pas de traitement des eaux usées, cela peut être un problème majeur. Le microbiote vivant à l'intérieur des animaux de ferme est régulièrement enrichi en vue d'une résistance aux antibiotiques, et ensuite, ces organismes résistants survivants sont libérés dans l'environnement par les quantités importantes de matières fécales produites dans les fermes. Ces bactéries peuvent ensuite se propager sur des distances considérables en étant transportées dans les eaux de ruissellement provenant de la pluie ou d'autres sources.

Tout cela est d'autant plus gênant que, chez les bactéries, ces gènes de résistance peuvent se propager d'une manière différente de nos gènes. Vous obtenez votre ADN de votre mère et de votre père, et nulle part ailleurs. Les bactéries, en revanche, peuvent être un peu moins strictes quant à l'endroit où elles obtiennent de l'ADN. Les bactéries vont souvent prélever de l'ADN dans l'environnement ou échanger l'ADN des bactéries voisines sous forme de plasmide. Un plasmide est un petit segment circulaire d'ADN qui contient une origine de réplication et quelques gènes. Là où la plupart de l'ADN bactérien est transmis asexuellement directement des parents à la progéniture dans un seul génome circulaire (ce que nous appelons la transmission verticale), les plasmides peuvent être transmis à la fois verticalement et horizontalement, d'un organisme non apparenté à un autre, souvent même entre espèces différentes. Cela signifie qu'une fois que la résistance évolue dans une espèce, si ce gène de résistance finit par faire partie d'un plasmide, il peut se propager relativement rapidement à de nombreuses espèces différentes. Les gènes des plasmides peuvent même être intégrés dans le chromosome d'une bactérie, ce qui permet une transmission verticale plus stable de la résistance. Aujourd'hui, de nombreux plasmides sont transmis dans l'environnement (parfois appelés ADNe, ou ADN environnemental) qui contiennent non pas un, mais plusieurs gènes de résistance.

En fin de compte, nous pouvons nous attendre à ce que des populations de bactéries résistantes aux antibiotiques émergent et deviennent plus courantes chaque fois que la pression sélective des antibiotiques est appliquée régulièrement. Il s'agit là, en effet, d'un puissant exemple de l'évolution en action. Toutefois, cela ne signifie pas que les bactéries changent d'une manière ou d'une autre lorsque des antibiotiques sont appliqués ; cela signifie simplement que les bactéries qui sont sensibles

C) Que faire ?

Le problème de la résistance aux antibiotiques est un peu paradoxal. L'utilisation d'antibiotiques entraîne la propagation de la résistance au sein d'une population de bactéries, ce qui rend nos antibiotiques inutiles. Si nous voulons empêcher la propagation de nouvelles souches résistantes, nous devons cesser d'utiliser cet antibiotique, mais ce n'est pas une bonne solution pour une personne malade qui a besoin d'un traitement.

Pourtant, pratiquement tous les experts s'accordent à dire que le problème de la propagation de la résistance aux antibiotiques pourrait être considérablement ralenti si les antibiotiques étaient utilisés beaucoup moins souvent et beaucoup plus judicieusement. Lorsque les antibiotiques sont utilisés trop largement, les bactéries sont soumises à une pression sélective constante pour développer et maintenir une résistance. Mais lorsque les antibiotiques ne sont pas présents, nous savons que les bactéries non résistantes vont régulièrement dépasser les souches résistantes et que les populations auront tendance à devenir moins résistantes au fil du temps. Le consensus général est donc que les antibiotiques devraient être utilisés avec beaucoup plus de parcimonie qu'ils ne le sont généralement, et que les antibiotiques spécifiques de "dernière ligne de défense" ne devraient être utilisés qu'en cas d'absolue nécessité. Cela est vrai pour l'utilisation chez l'homme, mais aussi et surtout pour l'utilisation en santé animale. Déjà, l'utilisation

d'antibiotiques pour favoriser la croissance du bétail a été interdite en Europe et une directive de la FDA a interdit cette pratique aux États-Unis en 2017. Mais beaucoup de gens pensent que cela ne va pas assez loin. Les médicaments peuvent toujours être utilisés sous la supervision de vétérinaires pour traiter et même prévenir les maladies des animaux, et dans de nombreux pays du monde, il n'existe aucune restriction. Pour prévenir la propagation de la résistance aux antibiotiques, nous pouvons connaître certaines mesures importantes à prendre ; en fait, il est beaucoup plus difficile de les prendre.

5. Étude de cas :

Note : L'étude de cas suivante représente une épidémie fictive d'une menace réelle et croissante de résistance aux antibiotiques. Elle est présentée comme un scénario possible pour que les élèves puissent étudier comment la résistance aux antibiotiques dans l'environnement peut être considérée comme un problème réel et croissant.

Faits du cas

Une épidémie d'E. coli a infecté 42 personnes dans 12 États différents. Les personnes hospitalisées ont présenté de graves symptômes d'intoxication alimentaire, notamment une diarrhée hémorragique et quelques cas d'insuffisance rénale. Les médecins traitant les patients ont immédiatement administré l'antibiotique imipenem, un puissant médicament de la classe des antibiotiques carbapenem. Les patients n'ont pas répondu au traitement. Les médecins soupçonnent que les E. coli étaient résistants aux carbapénems et sont passés à un autre antibiotique, la colistine. Heureusement, la plupart des patients ont répondu au nouveau traitement. Néanmoins, 8 des 42 patients sont morts.

Des tests ultérieurs ont confirmé que l'E. coli possédait un plasmide contenant le gène bla_{NMD-1}, un gène de résistance aux carbapénèmes relativement nouveau mais en expansion.

Les responsables de la santé publique ont retracé la source de l'infection jusqu'au porc contaminé provenant d'une seule ferme. L'élevage de porcs produit des quantités considérables de déchets de fumier, et les exploitations voisines craignent maintenant que ces déchets ne propagent les gènes responsables de la résistance au carbapénème dans le sol et dans l'eau. Deux fermes en particulier, **Apple Point Farms** et **Barrow Creek Farm**, ont pris contact avec les responsables de la santé publique pour tenter d'évaluer leur risque éventuel. Des échantillons de sol ont été prélevés dans ces fermes afin de tester la présence du gène bla_{NDM-1}.

Informations sur les carbapénèmes

Les carbapénèmes sont des antibiotiques qui ne sont généralement utilisés que dans des situations extrêmes de dernier recours et sont considérés comme l'une de nos dernières lignes de défense contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. En 2007, cependant, un homme a été infecté en Inde par une souche de bactérie qui s'est révélée résistante au traitement aux carbapénèmes. Des tests ultérieurs ont montré que la résistance était due à un gène codant pour une protéine qui décompose les carbapénèmes. Cette protéine a été appelée NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase 1), une carbapénase qui hydrolyse les carbapénèmes. Le gène qui code pour NDM-1, bla_{NMD-1}, était situé sur un plasmide qui peut être disséminé par transfert horizontal de gènes. Le gène bla_{NMD-1} s'est depuis lors répandu dans le monde entier et a été trouvé dans des milieux allant de l'eau potable de New Delhi aux hôpitaux des États-Unis. La propagation de ce gène de résistance a été particulièrement alarmante ; en dix ans à peine, il est passé d'un état totalement inconnu à une identification dans des échantillons du monde entier.

Les carbapénèmes étant réservés à l'usage hospitalier, l'identification de la résistance dans les milieux environnementaux est particulièrement inquiétante. Mais si le NDM-1 offre une résistance aux carbapénèmes, il offre également une résistance à plusieurs autres antibiotiques, dont certains sont régulièrement utilisés en agriculture. Il est possible que l'utilisation généralisée de ces autres antibiotiques plus couramment utilisés alimente la propagation du bla_{NMD-1} dans les milieux environnementaux.

Le TP d'aujourd'hui

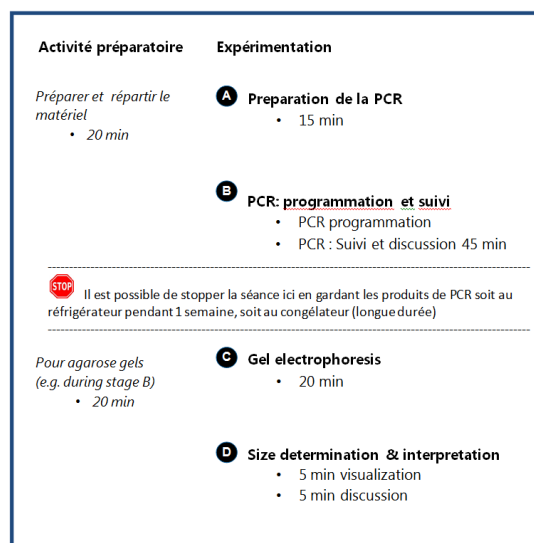
Vous recevrez de l'ADN extrait du sol de deux fermes, Apple Point et Barrow Creek, et utiliserez la PCR pour déterminer si le bla_{NMD-1} est présent dans l'un, les deux ou aucun des échantillons environnementaux. Vous utiliserez des amorces spécifiques au bla_{NMD-1} pour tester le gène de résistance. Lorsque le bla_{NMD-1} est présent dans un échantillon, ces amorces vont amplifier un fragment d'ADN de 700 paires de bases. Une deuxième série d'amorces sera utilisée pour amplifier une région de 400 paires de bases du gène de l'ARN ribosomique 16S. Cette deuxième série d'amorces sera utilisée comme contrôle PCR, pour s'assurer que l'ADN était présent dans l'échantillon et que l'amplification de l'ADN dans la PCR a réussi. Vous recevrez également un échantillon d'ADN extrait d'un isolat d'E. coli connu pour contenir du bla_{NMD-1} et un second échantillon d'ADN d'un isolat d'E. coli connu pour être sensible au carbapénème. Ces échantillons d'ADN serviront de témoins positifs et négatifs pour votre expérience.

Vous devez déterminer si le gène bla_{NMD-1} répand la résistance dans les fermes d'Apple Point ou de Barrow Creek.

Cette expérience comporte 4 étapes :

- A. Mise en place de la réaction PCR
- B. Programmation et suivi du PCR
- C. Séparation des produits de la PCR par électrophorèse de l'ADN
- D. Détermination de la taille des produits PCR et interprétation

Un aperçu du plan expérimental de 90 minutes est représenté ci-dessous :



Guide rapide : Activités préparatoires

A. Mise en place de la PCR

- Décongeler les tubes contenant les amorces et les échantillons d'ADN en les plaçant sur un support ou dans un bain-marie à température ambiante
- Pour chaque binôme, il faut étiqueter et distribuer six tubes :
 - EZ PCR Master Mix 20 μ L
 - Mélange d'amorces TAPE 40 μ L
 - ADN d'Apple Point 10 μ L
 - ADN de Barrow Creek 10 μ L
 - ADN témoin négatif 10 μ L
 - ADN témoin positif 10 μ L
- Chaque binôme aura besoin de plus :
 - Micropipettes (nous recommandons une gamme de 2-20 μ L)
 - Embouts de micropipette jetables et un petit gobelet ou une tasse pour les jeter
 - 4 tubes PCR (200 μ L)
 - Un marqueur permanent (à pointe fine)

B. Programmation et suivi du PCR

- Veiller à ce que le banc de chaque binôme soit équipé d'un Thermocycleur et d'une alimentation électrique
- S'assurer que les appareils miniPCR qui vont être contrôlés par la réaction PCR sont connectés à un ordinateur ou à une tablette compatible

C. Électrophorèse sur gel

- Les gels peuvent être versés avant le cours (comme décrit ci-dessous)
- Les gels peuvent être conservés au réfrigérateur, dans un récipient scellé ou enveloppé dans du film plastique, et protégés de la lumière
- Si l'électrophorèse est faite au cours d'une autre séance, les tubes de réaction PCR peuvent être conservés au réfrigérateur pendant une semaine au maximum jusqu'à leur utilisation, ou au congélateur pour une conservation à plus long terme.

D. Détermination de la taille et interprétation

- Ayez à portée de main le modèle de l'échelle d'ADN 100bp pour vous aider à interpréter les résultats de l'électrophorèse

7. Guide de l'instructeur de laboratoire

A. Mise en place de la PCR

- Étiqueter 4 tubes PCR (tubes de 200 µl) par binôme. Étiqueter les tubes sur la paroi latérale.
 - 1 tube étiqueté "A" : ADN de la ferme d'Apple Point
 - 1 tube étiqueté "B" : ADN de la ferme de Barrow Creek
 - 1 tube marqué "N" : ADN de contrôle négatif" provenant de bactéries non résistantes
 - 1 tube marqué "P" : ADN de contrôle positif" provenant de bactéries résistantes au carbapénème
- Étiqueter également chaque tube avec le nom du groupe sur la paroi latérale
- Ajouter des réactifs PCR à chaque tube PCR de 200 µl

	Tube A	Tube B	Tube N	Tube P
Template DNA	DNA From Apple Point 10 µL	DNA From Barrow Creek 10 µL	Negative Control 'non-resistant' DNA 10 µL	Positive Control 'resistant' DNA 10 µL
PARE Primer Mix	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
5X EZ PCR Master Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
TOTAL VOLUME	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL

Utilisez une micropipette pour ajouter chacun des réactifs. N'oubliez pas de changer de cône à chaque étape !

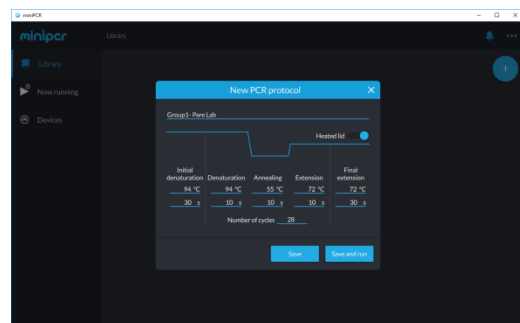
- Mélangez doucement les réactifs en pipettant de haut en bas 3-4 fois, bouchez les tubes
 - Assurez-vous que tout le volume de liquide s'accumule au fond du tube (si nécessaire, faites tourner brièvement les tubes à l'aide d'une microcentrifugeuse)
- Placez les tubes à l'intérieur de l'appareil PCR
 - Appuyez fermement sur les bouchons des tubes pour assurer un ajustement serré
 - Fermez le couvercle de l'appareil PCR et serrez-le doucement

B. Programmation et surveillance de la PCR (illustrée à l'aide du logiciel miniPCR®)

Note : selon la version du logiciel utilisé, les procédures de programmation peuvent varier légèrement, mais il n'y a pas de changement des températures, des temps et du nombre de cycles utilisés.

- Ouvrez l'application logicielle miniPCR et restez sur l'onglet "Protocol Library". Cliquez sur le "Nouveau protocole" ou sur le bouton
- Sélectionnez le "Type de protocole" PCR dans le menu déroulant supérieur
- Entrez un nom pour le protocole ; par exemple "Groupe 1 - TAPE Lab".
- Entrez les paramètres du protocole PCR :

- Dénaturation initiale 94°C, 30 sec
- Dénaturation 94°C, 10 sec
- Hybridation 55°C, 10 sec
- Elongation 72°C, 10 sec
- Nombre de cycles 28
- Extension finale 72°C, 30 sec
- Couvercle chauffant ON



- Cliquez sur "Save" pour enregistrer le protocole ou sur "Save and Run" pour commencer le protocole immédiatement.

- Assurez-vous que l'interrupteur d'alimentation est en position "ON"
 - Pour les versions antérieures du logiciel (v1.6), vous devrez cliquer sur "Télécharger vers miniPCR" dans le coin inférieur droit de la fenêtre.
 - Si vous y êtes invité, sélectionnez le numéro de série de votre machine miniPCR dans la fenêtre de dialogue. Les numéros de série sont situés à côté du port USB.
7. Cliquez sur l'onglet "miniPCR [nom de la machine]" pour commencer à surveiller la réaction de la PCR

Le logiciel miniPCRTM permet à chaque binôme de surveiller les paramètres de réaction en temps réel et d'exporter les données de réaction pour analyse sous forme de feuille de calcul.

Une fois la PCR terminée (environ 30-40 minutes), l'écran affiche "Status" : Terminé" et toutes les LED de votre miniPCR s'allumeront.

Vous pouvez maintenant ouvrir le couvercle du miniPCR et retirer vos tubes PCR.

o Faites attention à ne pas toucher le couvercle métallique qui peut être encore chaud

Le produit PCR peut maintenant être conservé jusqu'à une semaine au réfrigérateur ou un an au congélateur.

C. Électrophorèse sur gel - Versement de gels d'agarose (Activité préparatoire)

Si le TP se déroule en une seule fois, des gels d'agarose doivent être préparés pendant la PCR pour permettre aux gels de se déposer.

Si le TP se déroule en deux séances, les gels peuvent être préparés jusqu'à un jour avant la deuxième séance et conservés au réfrigérateur, couverts d'un film plastique et protégés de la lumière.

1. Préparer un plateau de coulée de gel d'agarose propre et sec
 - Placez un peigne bien formé au sommet du gel (4 voies par groupe plus échelle d'ADN)
2. Pour chaque binôme, préparer un gel d'agarose à 1,6 % en utilisant un tampon TBE 1X
 - Ajustez les volumes et les poids en fonction de la taille de votre plateau de gel
 - par exemple, ajouter 0,32 g d'agarose à 20 ml de 1X TBE pour le système blueGel™
 - Mélanger les réactifs dans un flacon de verre ou un bécher et faire tourner pour mélanger
 - Si vous utilisez blueGel Tabs™
 - o Utiliser un comprimé par 25 ml si vous faites un gel
 - o Deux comprimés dans 50 ml peuvent constituer jusqu'à trois gels
3. Chauffer le mélange à l'aide d'un micro-ondes ou d'une plaque chauffante
 - Jusqu'à ce que la poudre d'agarose soit dissoute et que la solution devienne claire
 - Soyez prudent, car le mélange a tendance à faire des bulles et est très chaud
4. Laissez la solution d'agarose refroidir pendant environ 2-3 min à température ambiante.
 - Faites tourner le ballon par intermittence

5. Ajouter un colorant de coloration en gel (par exemple GelGreen™)
 - Suivre les instructions du fabricant de colorants
 - Généralement, 1,0 µl de colorant de coloration par 10 ml de solution d'agarose (2 µl par 20 ml de gel)
6. Versez la solution d'agarose refroidie dans le plateau de coulée du gel à l'aide d'un peigne
7. Laissez le gel se solidifier complètement (jusqu'à ce qu'il soit ferme au toucher) et retirez le peigne
 - Généralement, 15-20 minutes
8. Placer le gel dans la chambre d'électrophorèse et le recouvrir de tampon TBE 1X

D. Électrophorèse sur gel - migration

1. S'assurer que le gel est complètement immergé dans le tampon d'électrophorèse 1X TBE
 - S'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air dans les puits (secouer doucement le gel si des bulles doivent être délogées)
 - Remplissez tous les réservoirs de la chambre d'électrophorèse et ajoutez juste assez de tampon pour couvrir le gel et les puits

2. Chargez les échantillons PCR sur le gel dans l'ordre suivant

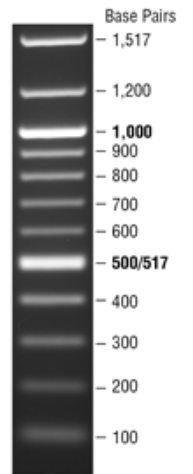
- Voie 1 : échelle d'ADN de 10µL
- Voie 2 : PCR de 15µL de la ferme A
- Voie 3 : PCR de 15µL de la ferme B
- Voie 4 : PCR de contrôle négatif (N) de 15µL
- Voie 5 : PCR de 15µL du contrôle positif (P)

Remarque : il n'est pas nécessaire d'ajouter un colorant de charge de gel à vos échantillons. miniPCR EZ PCR Master Mix et 100 bp DNA Ladder sont Load-Ready™ !

3. Placez le couvercle sur la boîte d'électrophorèse sur gel
 - Veiller à ce que les bornes des électrodes soient bien en place
4. Insérez les fils du terminal dans l'alimentation électrique (non nécessaire si vous utilisez blueGel™)
5. Si vous utilisez blueGel™, il suffit d'appuyer sur le bouton "Run". Sinon, réglez le voltage à 100-130V. Effectuez l'électrophorèse pendant 15-20 minutes, ou jusqu'à ce que le colorant ait progressé jusqu'à environ la moitié de la longueur du gel
 - Vérifiez que de petites bulles se forment près des terminaux dans la boîte
 - Un temps d'électrophorèse plus long permet d'obtenir une meilleure résolution de la taille
6. Une fois l'électrophorèse terminée, coupez l'alimentation et retirez le gel de la boîte (inutile si vous utilisez blueGel™ qui possède un illuminateur intégré)

E. Détermination de la taille et interprétation

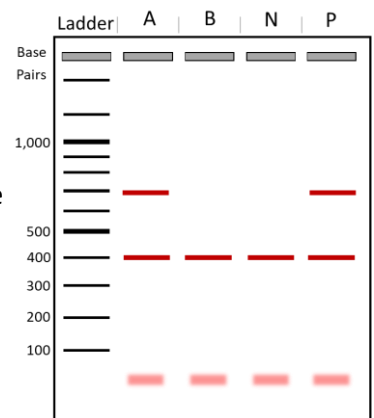
- Placez le gel sur le transilluminateur (ou allumez l'illuminateur blueGel™)
 - Portez des lunettes de protection contre les UV si vous utilisez la lumière UV (pas nécessaire avec blueGel)
- Vérifier la présence de produit PCR
- S'assurer que la résolution des bandes d'ADN est suffisante dans la gamme 400-800 pb de l'échelle d'ADN 100 pb
 o Faire fonctionner le gel plus longtemps si nécessaire pour augmenter la résolution
 o L'échelle d'ADN doit ressembler approximativement à celle qui est présentée
- Documenter la taille des fragments d'ADN amplifiés par PCR en comparant les produits de la PCR au marqueur de référence de poids moléculaire (échelle d'ADN de 100 pb)
 - Capturez une image avec l'appareil photo d'un smartphone
 - Si possible, utilisez un système de documentation du gel



F. Résultats attendus de l'expérience

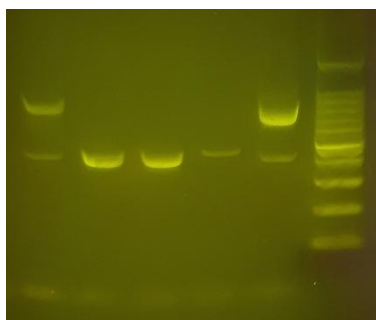
Cette image schématique montre les résultats expérimentaux idéalisés

- L'intensité des bandes dépendra l'efficacité de la réaction PCR, de l'efficacité de la migration et de la qualité des réactifs et du système de détection
- Les schémas de migration du produit PCR varient en fonction la durée de l'électrophorèse de la tension d'électrophorèse



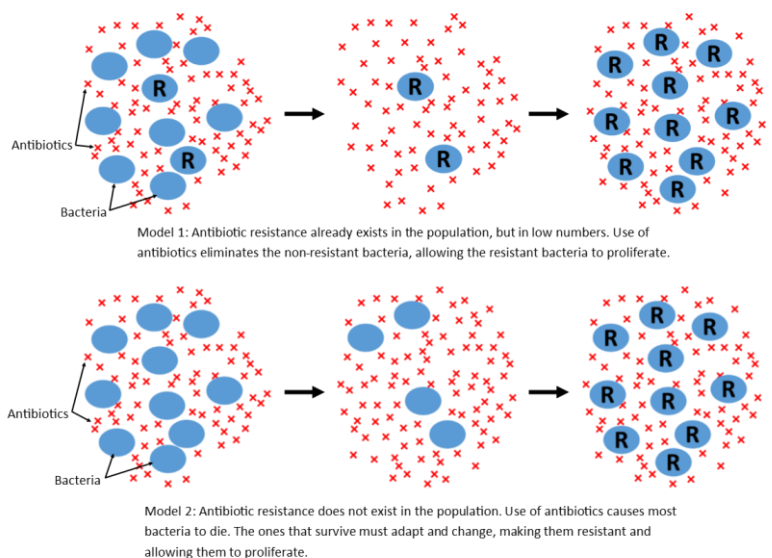
Il se peut que certaines bandes apparaissent moins fluorescentes que les autres.

A B B N P

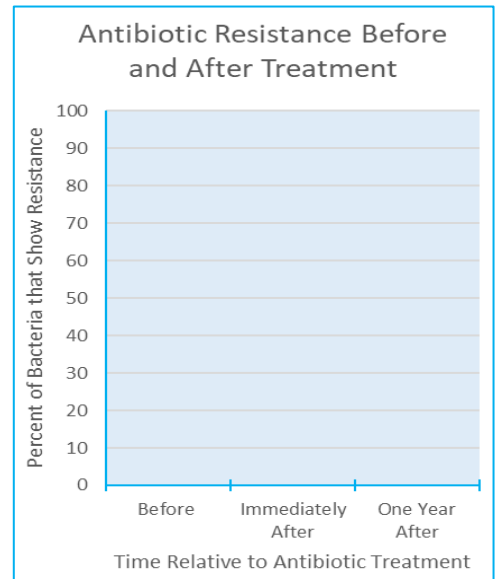


8. Questions d'analyse avant expérimentation

1. Lorsque les antibiotiques ont été introduits pour la première fois, il n'y avait pratiquement aucun agent pathogène humain qui présentait une résistance. Mais la résistance existait chez d'autres bactéries non pathogènes. Pourquoi ces autres bactéries auraient-elles pu être résistantes ?
2. Si un type particulier de bactéries est résistant aux antibiotiques, cela signifie-t-il qu'il est mauvais pour vous ?
3. Évaluez cette affirmation : "L'utilisation d'antibiotiques rend les bactéries résistantes."
4. Expliquez la différence entre la transmission verticale et horizontale de l'ADN. Pourquoi la transmission horizontale aggrave-t-elle potentiellement le problème de la résistance aux antibiotiques ?
5. Si vous deviez prélever des bactéries dans un intestin humain sain, pensez-vous que vous trouveriez des gènes de résistance aux antibiotiques ? Expliquez votre réponse.
6. Pourquoi l'utilisation constante de faibles doses d'antibiotiques dans les exploitations agricoles serait-elle plus problématique pour le développement de la résistance aux antibiotiques que l'administration occasionnelle de très fortes doses uniquement lorsque les animaux sont malades ?
7. Deux modèles d'évolution de la résistance aux antibiotiques sont présentés ci-dessous. Selon vous, quel modèle est le plus précis ? Justifiez votre réponse à l'aide de preuves tirées du texte ou d'autres sources.

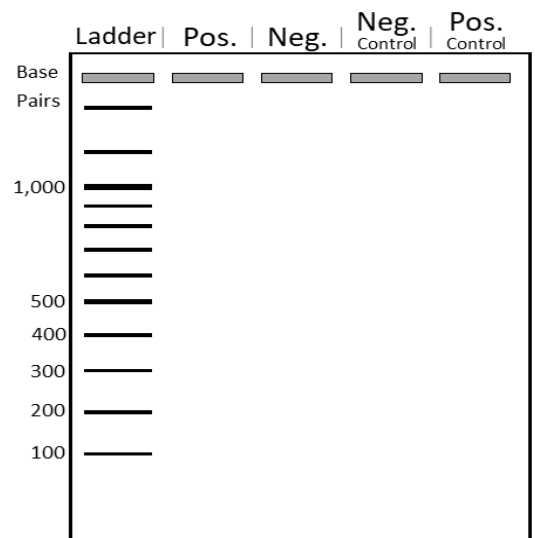


8. Sur le graphique de droite, imaginez qu'un agriculteur remarque une éventuelle maladie se développant dans son troupeau. Pour combattre la maladie, il administre un traitement antibiotique. Si des bactéries ont été prélevées dans le sol de cette ferme, prévoyez quel sera le pourcentage de bactéries résistantes aux antibiotiques avant, immédiatement après et un an après le traitement. Vous n'êtes pas censé connaître les chiffres exacts, mais essayez de prévoir de manière générale quand la résistance sera élevée ou faible.



9. Expliquez pourquoi vous avez dessiné ce que vous avez fait sur le graphique.

10. Avant de faire fonctionner votre gel d'électrophorèse, prévoyez vos résultats possibles. Dessinez des bandes sur le gel à l'endroit où vous vous attendez à les voir. Une échelle d'ADN indiquant la taille des fragments d'ADN est fournie dans la première bande.



Questions d'analyse après expérimentation

1. L'un des échantillons environnementaux était-il positif pour le gène blaNDM-1 ?

2. Dans ce kit, nous cherchons à savoir si la résistance au carbapénème est présente dans deux échantillons environnementaux différents. Expliquez alors pourquoi vous avez effectué quatre réactions PCR.

3. La raison de cette expérience était de tester la présence d'un seul gène blaNDM-1. Pourquoi alors nos résultats positifs ont-ils deux bandes sur le gel ? Quel est l'intérêt de la deuxième bande ?

4. L'utilisation des carbapénèmes est limitée au milieu hospitalier aux États-Unis. Pourquoi trouverait-on des bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un cadre environnemental ?

5. Si vous avez trouvé le gène blaNDM-1 dans le sol de l'une ou des deux fermes, cela prouve-t-il que la nourriture provenant de ce site n'est pas sûre à consommer ? Pouvez-vous imaginer des possibilités qui pourraient conduire à la découverte du gène blaNDM-1 dans l'environnement autre que celui provenant de l'E. coli pathogène ?

6. Quelle est votre recommandation aux agriculteurs si des gènes de résistance aux antibiotiques sont trouvés sur leur propriété ? Que peuvent-ils faire pour résoudre le problème ?

Question à débattre : Imaginez que vous êtes un agriculteur qui élève des porcs. Vous savez que l'utilisation d'antibiotiques dans votre alimentation augmentera le taux de croissance de vos animaux et réduira la fréquence de propagation des infections dans votre troupeau. Mais vous savez aussi que l'utilisation régulière d'antibiotiques dans l'alimentation contribue à d'éventuelles crises sanitaires futures sous la forme d'une résistance aux antibiotiques. Cesserez-vous volontairement d'ajouter des antibiotiques dans l'alimentation de vos animaux ? Pourquoi ou pourquoi pas ? Quel serait le facteur décisif qui vous ferait changer d'avis ?