

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/PLOU/MA/4/Rev04

Ref ennov : PPN/INS/0804

Janvier 2020

Détection du virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) par RT-PCR en temps réel

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Laboratoire National de Référence pour les maladies réglementées des poissons



Historique de la méthode

Une méthode est mise à jour afin de prendre en compte des modifications.

Une modification est qualifiée de majeure lorsqu'elle concerne le processus analytique, le domaine d'application ou des points critiques de la méthode, dont la prise en compte peut modifier les performances de la méthode d'analyse et/ou les résultats. Une modification majeure induit des adaptations. La méthode ainsi modifiée a fait l'objet d'une nouvelle validation, totale ou partielle.

Une modification est qualifiée de mineure si elle apporte des précisions utiles ou pratiques, reformule les propos pour les rendre plus clairs ou plus précis, rectifie des erreurs bénignes. Une modification mineure est sans influence sur les performances de la méthode et ne requiert pas une nouvelle validation.

Le tableau ci-dessous récapitule l'historique des versions de la présente méthode, incluant la qualification des modifications.

Version	Nature des modifications (majeure/mineure)	Date	Principales modifications
V04 **	Mineures	Janvier 2020	Intégration des commentaires suite à consultation de la V03 : <ul style="list-style-type: none">• §1 : précision sur les organes ciblés : rein, rate et cœur et/ou cerveau• §6.2 : précision sur les consommables pour automates• Annexe 2 : quelques ajouts
V03 *	Majeures	Novembre 2019	<ul style="list-style-type: none">• Mise à jour codification PPN et de la bibliographie• §8.3.2 Intégration d'un mode d'extraction semi automatisée utilisant des billes magnétiques• Nouvelles données sur les LD_{PCR} et LD_{méthode}
V02	Mineures	Juin 2019	Modifications suite aux remarques de la mise en consultation : <ul style="list-style-type: none">• §5.4 : précision sur la préparation du témoin positif cible d'amplification Modification des valeurs des LD _{PCR} et LD _{méthode} suite à modification d'interprétation du signal (interne au LNR)
V01	Création	Avril 2019	Version initiale

* La version 03 a fait l'objet d'une consultation en novembre 2019 sur le site internet de l'Agence ;

** La version 04 est la version publiée.



Avant-propos

La présente méthode a été développée, validée et rédigée par le Laboratoire National de Référence pour les maladies réglementées des poissons :

Anses - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort

Laboratoire National de Référence pour les maladies réglementées des poissons

Unité Pathologies Virales des Poissons (PVP)

CS 10070 – Site Ifremer

29280 PLOUZANÉ

Contact : 02 98 22 44 62

Adresse mail : lnr.poissons@anses.fr



Sommaire

Avant-propos.....	3
Sommaire	4
Table des figures	5
Table des tableaux	5
Introduction.....	6
Avertissements et précautions de sécurité.....	7
1 Objet et domaine d'application.....	8
2 Documents de référence.....	8
3 Termes, sigles et définitions.....	8
4 Principe de la méthode	9
4.1 Broyage des organes.....	9
4.2 Extraction des acides nucléiques	9
4.3 Amplification par RT-rPCR et détection	10
5 Réactifs	11
5.1 Tampon PBS et milieu de culture	11
5.2 Extraction des acides nucléiques	11
5.2.1 Kits d'extraction.....	11
5.2.2 Témoins positifs de processus non-cibles externes exogènes.....	11
5.2.3 Témoin positif de processus cible	12
5.3 Réactifs pour la RT-rPCR	12
5.3.1 Eau.....	12
5.3.2 Réactifs.....	12
5.3.3 Amorces et sondes.....	12
5.4 Témoin positif de PCR.....	12
6 Appareillage et matériels.....	13
6.1 Matériels et consommables utilisés pour le broyage de l'échantillon	13
6.2 Matériels et consommables utilisés pour l'extraction des acides nucléiques.....	13
6.3 Matériels et consommables utilisés pour la RT-rPCR	13
7 Échantillons.....	14
7.1 Modalités d'échantillonnage et de transfert des échantillons	14
7.2 Conservation des échantillons avant analyse.....	14
7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse	14
8 Mode opératoire	15
8.1 Broyage des organes.....	15
8.1.1 Broyage en tube à billes et centrifugation.....	15
8.1.2 Broyage en mortier et pilon et centrifugation	15
8.2 Préparation des acides nucléiques.....	15
8.2.1 Kit d'extraction en colonne avec membrane de silice.....	15
8.2.2 Kit d'extraction en billes magnétiques avec automate.....	16
8.3 Amplification par PCR.....	17
8.3.1 Préparation des mélanges réactionnels de la PCR en temps réel.	17
8.3.2 Échantillons	17



8.3.3	Témoins	17
8.3.4	Programme d'amplification RT-rPCR.....	18
9	Résultats	19
9.1	Calculs et expression des résultats.....	19
9.2	Contrôle de la validité des résultats.....	19
9.2.1	Vérification des témoins	19
9.2.2	Analyse du statut des échantillons	20
10	Caractéristiques de performance de la méthode	21
Annexe 1	23
Annexe 2	24
Annexe 3	25
Annexe 4	26
Bibliographie	27
Textes réglementaires	27

Table des figures

Figure 1: Stratégie de diagnostic du vSHV par RT-rPCR à partir de surnageant de culture ou de broyat d'organes, en incluant l'ensemble des contrôles qualité.	10
--	----

Table des tableaux

Tableau 1 : Dénomination des témoins.....	9
Tableau 2 : Référence des kits d'extraction utilisés.....	11
Tableau 3 : Réactifs utilisés pour la RT-rPCR	12
Tableau 4 : Description des amorces et sondes	12
Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la RT-rPCR.	17
Tableau 6 : Programme d'amplification RT-rPCR pour les cibles vSHV et MS2	18
Tableau 7 : Résultats attendus des différents témoins	19



Introduction

Le virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) est un rhabdovirus présentant un spectre d'espèces hôtes extrêmement large pouvant être à l'origine de très importantes mortalités en salmiculture. Il fait l'objet d'une inscription sur la liste des maladies aquatiques de l'OIE (Code Sanitaire pour les animaux aquatiques, chapitre 1.3., 2017) (OIE, 2019) et est réglementé par l'Union Européenne (Directive 2006/88/CE). Au niveau national, il est classé comme danger de 1^{ère} catégorie (Arrêté du 29 juillet 2013).

La méthode officielle de confirmation de la présence du vSHV dans des tissus de poissons ou leurs fluides biologiques (liquide ovarien ou séminale) a pendant longtemps reposé sur une phase de mise en culture des échantillons recueillis sur lignées cellulaires adaptées suivie, en cas de visualisation d'effets cytopathiques (ECP), d'une identification par immunofluorescence, séroneutralisation / ELISA ou RT-PCR (Décision 2001/183/CE).

La Décision d'exécution 2015/1554, applicable depuis le 1^{er} avril 2016, abroge la décision 2001/183/CE. Elle porte modalités d'application de la Directive 2006/88/CE en ce qui concerne les exigences relatives à la surveillance et aux méthodes de diagnostic. Cette décision d'exécution enrichit le panel d'outils de détection officiel en donnant la possibilité de rechercher le vSHV directement par une approche moléculaire de reverse transcription couplée à une réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-rPCR). Cette évolution de la réglementation européenne est en phase avec le développement du diagnostic moléculaire observé ces dernières années dans le domaine de la pathologie des poissons et présage d'une utilisation de plus en plus fréquente de ce type d'approche.

La technique de RT-rPCR spécifique du vSHV publiée par Jonstrup *et al.* (2013), a été modifiée en y intégrant, afin de répondre aux exigences de la norme NF U47-600-1, une stratégie permettant de contrôler la qualité des étapes d'extraction et d'amplification au cours des analyses. Cette méthode a été développée en se calquant sur les conditions décrites pour la méthode interne de RT-rPCR ANSES/PLOU/MA/3 ciblant le virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI).

Le laboratoire a opté pour l'utilisation de deux témoins positifs de processus externes exogènes complémentaires :

- un témoin non-cible, pouvant être mis en œuvre quelle que soit l'espèce piscicole hôte. Deux bactériophages ont été sélectionnés afin de rendre le système opérationnel pour l'ensemble des virus pathogènes de poissons : un phage à ARN (MS2) et un phage à ADN (T4). Les amorces et sondes spécifiques sont celles proposées par Ninove *et al.* (2011). Pour la détection du vSHV, la RT-rPCR ciblant le phage MS2 sera réalisée en parallèle de façon systématique. L'avantage de ce témoin est de pouvoir être ajouté à chacun des échantillons analysés pour permettre une vérification individuelle du processus analytique.
- un témoin cible, traité en parallèle de chaque série d'extraction, et qui a pour objet de contrôler le bon fonctionnement de toutes les phases de l'analyse vis-à-vis de la cible vSHV à partir d'un échantillon artificiellement dopé.

Remarque 1 : Pour les laboratoires qui ne souhaitent réaliser qu'une recherche de vSHV ou d'un autre virus à ARN, l'ajout de phage T4 (phage à ADN) est optionnel. Il appartiendra au laboratoire, dans ce cas, de remplacer ce phage T4 par un volume équivalent de PBS. L'absence d'interférence due à la présence ou à l'absence du phage T4 sur la détection du vSHV a été démontrée par une étude complémentaire.

Remarque 2 : Suite aux résultats satisfaisants obtenus à l'issue d'une étude rétrospective menée au LNR afin d'évaluer les écarts de Ct entre les duplicats d'échantillons, le LNR laisse la possibilité aux laboratoires utilisateurs de la méthode de réaliser à leur convenance les dépôts en simplicat ou duplicat.



Avertissements et précautions de sécurité

Il convient que l'utilisateur de la présente méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation en vigueur.

Il est essentiel que les manipulations conduites conformément à la présente méthode soient exécutées par du personnel ayant reçu une formation appropriée.

Le vSHV est un virus à ARN simple brin (environ 11 kb) de classe 1, pathogène pour un certain nombre d'espèces piscicoles mais non-pathogène pour l'homme.

Le laboratoire met en œuvre les mesures nécessaires à la maîtrise des risques en lien avec ce pathogène et notamment les moyens permettant de prévenir sa dissémination dans l'environnement.

Les acides nucléiques (ARN) étant fragiles, il est fortement recommandé de respecter des bonnes pratiques de laboratoire afin d'éliminer toute activité RNase.



1 Objet et domaine d'application

La présente méthode d'analyse spécifie une méthode de détection moléculaire du vNHI par RT-rPCR utilisant un couple d'amorces et une sonde d'hydrolyse de type TaqMan (méthode en une étape ou « one step »). Cette méthode est qualitative. Elle détecte la présence d'acides nucléiques spécifiques du virus et s'applique à l'analyse de prélèvements d'organes de poissons (rein, rate et cœur et/ou cerveau) ou de surnageants de culture.

La méthode comprend deux témoins positifs de processus externes exogènes, cible et non cible, permettant de valider l'ensemble des étapes.

2 Documents de référence

- NF U47-600-1 : Méthodes d'analyse en santé animale-PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - partie 1 : Exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale (version 2015-02-F) ;
- NF U47-600-2 Méthodes d'analyse en santé animale-PCR (réaction de polymérisation en chaîne) - partie 1 : Exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale (version 2015-02-P) ;
- Jonstrup et al. (2013) : Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus
- Ninove et al. (2011): RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests

3 Termes, sigles et définitions

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ECH : Echantillon
- EMT : Ecart Maximal Toléré
- LNR : Laboratoire National de Référence
- NTC : No Template Control
- P/V : Poids/Volume
- PBS : Phosphate Buffer Saline
- PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
- RT : Reverse Transcription
- RT-rPCR : RT-PCR en temps réel
- SVF : Sérum de Veau Fœtal
- vSHV : Virus de la Septicémie Hémorragique Virale
- vNHI : Virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse
- vNPI : Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse

Dénomination des témoins selon le Tableau 1 ci-après :



Tableau 1 : Dénomination des témoins

Dénomination selon la norme NF U47-600 1	Nom dans les documents selon la cible
Échantillon pour analyse : <ul style="list-style-type: none"> cible non cible 	<ul style="list-style-type: none"> Échantillon (ECH) : ECH_{vSHV} Témoin de processus intrinsèque à l'échantillon : ECH_{MS2}
Témoin négatif de processus : <ul style="list-style-type: none"> cible et non cible 	<ul style="list-style-type: none"> E-
Témoin positif de processus : <ul style="list-style-type: none"> cible non cible 	<ul style="list-style-type: none"> E_{vSHV} E_{MS2}
Témoin négatif de PCR	<ul style="list-style-type: none"> NTC_{vSHV} NTC_{MS2}
Témoin positif de PCR	<ul style="list-style-type: none"> Témoin positif d'amplification PCR T_{amp}

4 Principe de la méthode

La méthode comprend les étapes consécutives suivantes :

- 1) Broyage des organes de poissons - en cas d'analyse directe (voir paragraphe 8.1) ;
- 2) Extraction des acides nucléiques en intégrant le témoin positif de processus non-cible. Cette étape a été validée selon deux protocoles aux principes différents : un kit manuel avec colonnes (membrane de silice) et un kit semi automatisé avec billes magnétiques (voir paragraphe 8.2) ;
- 3) Amplification et détection d'une partie du gène N du vSHV et d'une partie du gène de la réplicase du phage MS2 par RT-rPCR (voir paragraphe 8.2.2).

Elle a été validée pour deux matrices différentes : surnageant de broyat d'organes à 10% P/V et surnageant de culture.

4.1 Broyage des organes

Le broyage des organes peut se faire selon la méthode utilisée classiquement pour la culture cellulaire, avec mortier et pilon, ou en tube à billes avec un broyeur mécanique (Décision d'exécution 2015/1554 – Annexe 2 – Partie 1).

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.1.

4.2 Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques est réalisée : (voir 5.2.1)

- Soit à l'aide d'un kit commercial utilisant des colonnes de silice ;
- Soit à l'aide d'un automate (KingFisher DuoPrime, Thermo Scientific) et d'un kit commercial utilisant des billes magnétiques.

Ces kits sont recommandés pour l'extraction des acides nucléiques des virus à ARN et à ADN.

Afin d'avoir un contrôle de l'ensemble du processus (de la phase d'extraction à la RT-rPCR), deux témoins de processus non-cibles sont ajoutés à l'échantillon au démarrage de l'étape d'extraction (un phage à ARN (MS2) et éventuellement un phage à ADN (T4)).

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.2.



4.3 Amplification par RT-rPCR et détection

Deux amplifications distinctes (RT-rPCR simple) sont prévues (voir 5.3) :

- L'une amplifie un fragment de 77pb dans le gène de la Nucléoprotéine (N) du vSHV ;
- L'autre amplifie un fragment de 101pb dans le gène de la réplicase du phage MS2. Le vSHV étant un virus à ARN, la détection du phage T4 n'est pas nécessaire.

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.2.2.

Le principe de la méthode est présenté dans le schéma ci-dessous :

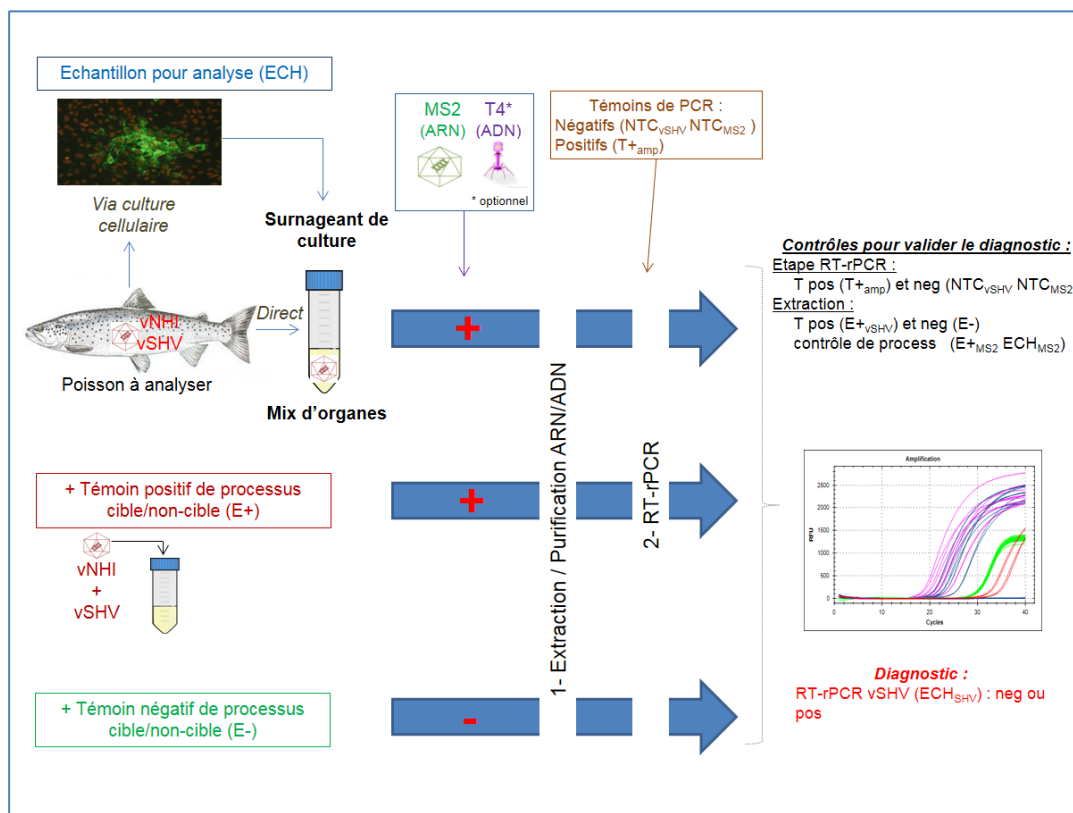


Figure 1: Stratégie de diagnostic du vSHV par RT-rPCR à partir de surnageant de culture ou de broyat d'organes, en incluant l'ensemble des contrôles qualité.



5 Réactifs

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des produits nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Pour l'ensemble des étapes, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et des consommables adaptés aux applications de biologie moléculaire et certifiés exempts de RNases et DNases, tel que spécifié dans la norme NF U 47-600-1.

5.1 Tampon PBS et milieu de culture

Ces réactifs sont utilisés dans les phases de broyage et servent de témoin négatif de processus d'extraction « E- ».

Le pH du tampon PBS utilisé est compris entre 7,2 et 7,3. A titre d'exemple, le PBS peut avoir la composition suivante : Chlorure de sodium : 7.65g/l, Phosphate disodique : 0.724g/l et Phosphate monopotassique : 0.21g/l (type Biomérieux, référence 33 011 ou 75 511).

Les milieux de culture sont à utiliser de préférence sans SVF.

5.2 Extraction des acides nucléiques

5.2.1 Kits d'extraction

Les références des kits d'extraction utilisés au laboratoire sont détaillées à titre indicatif dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : Référence des kits d'extraction utilisés

	Produit	Fabricant	Référence	Packaging
Extraction en colonne avec membrane de silice	NucleoSpin® Virus	Macherey Nagel	740983.10	10 extractions
			740983.50	50 extractions
			740983.250	250 extractions
Extraction avec automate et billes magnétiques	ADIAMAG™	BioX / Adiaçène	NADI003	200 réactions

L'automate utilisé au laboratoire pour les extractions avec kits à billes magnétiques est le modèle KingFisher Duo Prime, de marque Thermo Scientific.

5.2.2 Témoins positifs de processus non-cibles externes exogènes

Les témoins positifs de processus non-cibles ajoutés à l'échantillon initial avant extraction proviennent de suspensions stocks de phages MS2 et T4 produites par infection de bactéries *E.coli* sensibles puis titrées par la technique des plages de lyse (titres infectieux). Les niveaux de charge de ces suspensions ont été déterminés par RT-rPCR.

Les phages ont été produits en suivant un protocole adapté de la norme NF EN ISO 10705-1 et des recommandations du fournisseur ATCC (ATCC, 2015; ATCC, 2016).

Les suspensions de phages sont conservées à 5°C ± 3°C.



5.2.3 Témoin positif de processus cible

Un témoin de processus contenant la cible (E+) est intégré à chaque séance d'extraction. Ce témoin est constitué de la matrice broyat d'organes dopée par une quantité de surnageant de culture de vSHV (souche 07/71) comprise entre 10 et 100 fois la limite de détection de la méthode ($LD_{\text{méthode}}$). Celui-ci est le même pour les 2 protocoles d'extraction.

Afin de pouvoir être utilisé pour d'autres systèmes RT-rPCR, le témoin « E+ » contient également des quantités équivalentes de surnageant de culture du virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) et du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI).

5.3 Réactifs pour la RT-rPCR

5.3.1 Eau

Il est fortement recommandé d'utiliser de l'eau exempte de RNase et DNase, type eau PPI ou eau ultrapure.

5.3.2 Réactifs

Les références des différents réactifs utilisés au laboratoire sont détaillées à titre indicatif dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Réactifs utilisés pour la RT-rPCR

Produit	Fabricant	Référence	Packaging
SuperScript III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit	Invitrogen	11732-020	100 x 50µL reactions
		11732-088	500 x 50µL reactions

5.3.3 Amorces et sondes

Les séquences des amorces et des sondes employées pour la détection particulière des séquences du vSHV et du MS2 sont répertoriées dans le Tableau 4 :

Tableau 4 : Description des amorces et sondes

Cible	Nom	Séquence	%GC	Longueur	Taille amplicon	Référence	Autre nom
vSHV	oPVP224	AAACTCGCAGGATGTGTGCGTCC	56	23	77 pb	Jonstrup <i>et al.</i> , 2013	FW primer
	oPVP225	TCTGCGATCTCAGTCAGGATGAA	48	23			BW primer
	tqPVP6	[FAM] TAGAGGGCCTTGGTGATCTTCTG [BHQ1]	52	23			probe
MS2	oPVP446	CTCTGAGAGCGGCTCTATTGGT	54	22	101 pb	Ninove <i>et al.</i> , 2011	MS2F
	oPVP447	GTTCCCTACAACGAGCCTAAATTC	46	24			MS2R
	tqPVP25	[FAM] TCAGACACGCGGTCCGCTATAACGA [BHQ1]	56	25			MS2probe

5.4 Témoin positif de PCR

Un ARN (synthétique ou extrait à partir d'un surnageant de culture positif en vSHV) appelé « T_{amp} » est utilisé comme témoin positif cible de PCR pour vérifier le bon déroulement des étapes de RT et d'amplification.

Une suspension calibrée à une concentration comprise entre 1 et 10 fois la limite de détection de la PCR (LD_{PCR}) peut être préparée en grande quantité, aliquotée et conservée à une température $\leq -65^{\circ}\text{C}$.



6 Appareillage et matériels

Avertissement : Des appellations commerciales ou fournisseurs peuvent être mentionnées dans le descriptif des appareils et matériels nécessaires à la mise en œuvre de la présente méthode. Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la méthode et ne signifient nullement que l'Anses recommande l'emploi exclusif de ces matériels. Des matériels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Le matériel doit être approprié conformément à la norme NF U 47-600-1 et, en particulier, ce qui suit :

6.1 Matériels et consommables utilisés pour le broyage de l'échantillon

- Micropipettes et pointes à filtres, pour des volumes compris entre 5µL et 1000µL ;
- Tubes de broyage à billes certifiés RNase free, de type « Lysing Matrix D » (MP Biomedicals) ;
- Broyeur mécanique de type « Fast Prep » ou ensemble mortier / pilon / sable stérile.

6.2 Matériels et consommables utilisés pour l'extraction des acides nucléiques

- Micropipettes et pointes à filtres, pour des volumes compris entre 5µL et 1000µL ;
- Microtubes d'une capacité de 1,5 et 2,0mL supportant une centrifugation à 20 000g ;
- Bloc chauffant, pouvant être maintenu à 56°C et à 70°C ± 2°C ;
- Mélangeur de type vortex ;
- Centrifugeuse pour des microtubes de 1,5mL et 2,0mL, pouvant centrifuger jusqu'à 20 000g.
- Automate de type Thermo Scientific KingFisher Duo Prime
- Consommables pour automates : plaques Deep Well 96, peignes, tubes (selon modèle automate)

6.3 Matériels et consommables utilisés pour la RT-rPCR

- Micropipettes et pointes à filtres, d'une capacité comprise entre 5µL et 1000µL ;
- Distributeur pouvant délivrer des volumes de 20µL ;
- Tubes pour centrifugeuse, d'une capacité de 1,5mL et de 2,0mL ;
- Barrettes et bouchons pour PCR temps réel ;
- Mini-centrifugeuse pour barrettes ;
- Thermocycleur temps réel avec des longueurs d'ondes permettant la lecture du fluorophore FAM et avec un EMT de ±2°C ;
- Logiciel de détection et d'analyse approprié.



7 Échantillons

7.1 Modalités d'échantillonnage et de transfert des échantillons

Elles suivent les recommandations de la Décision d'Exécution 2015/1554, notamment concernant les tissus à prélever :

« La quantité de tissus de poisson nécessaire pour un examen virologique par RT-qPCR dépend de la taille des poissons. On prélèvera à l'aide d'instruments à dissections stériles l'alevin entier si la longueur du corps est inférieure à 4 cm, les viscères, y compris les reins si la longueur du corps est comprise entre 4 et 6 cm ou, dans le cas des poissons de plus grande taille, les reins, la rate, le cœur et/ou l'encéphale en ne prenant qu'un fragment de ces organes de façon à avoir un échantillon d'environ 1g. Les tissus de 10 poissons peuvent être rassemblés dans un tube pour constituer un échantillon global. Toutefois, si la quantité d'inoculum est faible, on regroupera les tissus provenant de cinq poissons au maximum. »

Il est préférable que l'échantillon soit réfrigéré après prélèvement puis transféré au laboratoire sous le régime du froid en 48h, à sec ou dans du milieu de transport. Dans le cas où le transport de l'échantillon du site de récolte au laboratoire n'est pas consécutif au prélèvement, l'échantillon peut être congelé à une température égale ou inférieure à -16°C puis transporté sous régime du froid.

7.2 Conservation des échantillons avant analyse

Avant mise en analyse, les échantillons doivent être conservés dans les conditions suivantes :

- En réfrigération à +5°C ± 3°C pendant 24 heures ;
- En congélation à une température inférieure à -16°C si l'analyse est différée.

La durée totale entre le prélèvement et la prise en charge par le laboratoire (début de l'analyse ou congélation du prélèvement) ne doit pas excéder 72 heures.

7.3 Conservation des échantillons ou reliquats après analyse

Les broyats des échantillons ainsi que les acides nucléiques extraits sont conservés à une température inférieure à -16°C pendant au minimum 1 mois, l'analyse devant pouvoir être reconduite en cas d'anomalie constatée à la lecture des résultats.



8 Mode opératoire

Pour la matrice « Surnageant de culture » qui ne nécessite pas d'étape de broyage, le mode opératoire débute directement à l'étape d'extraction (paragraphe 8.2).

8.1 Broyage des organes

Le broyage s'effectue sur un pool d'organes (paragraphe 7.1) soit en tube à billes avec un broyeur, soit en mortier et pilon avec un ratio d'environ 10% P/V de PBS (broyage en tube à billes) ou de milieu de culture (broyage en mortier et pilon).

8.1.1 Broyage en tube à billes et centrifugation

Une quantité de 0,1g d'organes pour 1mL de tampon PBS est ajoutée dans un tube à bille de 2mL de type « Lysing Matrix D » (MP Biomedicals). Le tube est soumis à un broyage en « Fast Prep » à raison d'un cycle de 20 secondes à la vitesse 4 à température ambiante. Une centrifugation de 3 minutes à 5000g est effectuée avant de récupérer le surnageant.

8.1.2 Broyage en mortier et pilon et centrifugation

Une quantité connue d'organes est transférée dans un mortier, puis broyée à l'aide d'un pilon et de sable. L'homogénat est repris par du milieu de culture supplémenté en antibiotiques de façon à avoir un ratio d'environ 10% P/V. L'ensemble est homogénéisé, transféré dans un tube et centrifugé 15 minutes à une vitesse comprise entre 2000 et 4000g à une température inférieure à 14°C.

8.2 Préparation des acides nucléiques

Un mode opératoire d'extraction des acides nucléiques approprié pour les virus à ARN doit être utilisé.

8.2.1 Kit d'extraction en colonne avec membrane de silice

L'extraction d'ARN est réalisée avec le kit NucleoSpin® Virus (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur et quelques modifications. Le mode opératoire utilisé est brièvement rappelé ci-dessous.

Le tampon de lyse VL est réparti dans des microtubes de 2mL à raison de 200µL par tube. Sont ajoutés l'ARN carrier (5,6µL), la protéinase K (5µL), les phages MS2 (10µL) et T4 ou PBS* (10µL). Un volume de 180µL d'échantillon (ECH) (broyat d'organes centrifugé ou surnageant de culture) est ensuite déposé dans chacun des tubes. L'ensemble est mélangé (vortex léger) puis mis à incuber 15 minutes à 70°C. Un tube « E+ » (contenant la matrice broyat d'organes dopée par du surnageant viral) est traité en parallèle. Un tube « E- » (contenant uniquement le tampon VL, l'ARN carrier, la protéinase K et 200µL de PBS) est également préparé.

Le lysat est centrifugé quelques secondes puis un volume de 200µL d'éthanol absolu est ajouté et mélangé (vortex léger). Après 5 minutes à température ambiante et une courte centrifugation, les 610µL sont déposés sur la colonne. Une centrifugation de 3 minutes à 4000g est effectuée pour fixer les acides nucléiques sur la membrane. Ils sont ensuite purifiés en ajoutant 400µL de tampon VW1 puis de tampon VW2 avec des étapes de centrifugation de 30 secondes à 11 000g. Un 3^{ème} lavage est réalisé en ajoutant 200µL de tampon VW2 sur la colonne puis en centrifugeant 5 minutes à 20 000g.

A l'issue de cette étape, le tube de collecte est éliminé et la colonne est transférée dans un nouveau microtube de 1,5mL qui est placé pendant 5 minutes à 56°C (avec le couvercle de la colonne ouverte pour améliorer le séchage).



Les acides nucléiques sont finalement élués en ajoutant sur la colonne 200µL d'eau exempte de RNase/DNase préchauffée à 70°C. Après 3 minutes d'incubation à température ambiante, celle-ci est centrifugée 3 minutes à 20 000g. La colonne est ensuite éliminée et l'éluat conservé (voir ci-dessous).

Un schéma récapitulatif des différentes phases d'extraction des acides nucléiques est présenté en Annexe 1.

8.2.2 *Kit d'extraction en billes magnétiques avec automate*

L'extraction d'ARN est réalisée avec l'automate KingFisher Duo Prime et le kit ADIAMAG™ (Bio-X diagnostics) (kit compatible avec les appareils KingFisher ML et 96/Flex ; se référer à la notice du fournisseur).

Le mode opératoire utilisé est brièvement rappelé ci-dessous.

Une plaque Deep Well 96 puits est préparée en fonction du nombre d'échantillons à extraire, avec 350µL de tampon de lavage W3 par puit de la rangée C, 350µL de tampon de lavage W4 par puit de la rangée D, 350µL d'éthanol à 80% par puit de la rangée E, et 100µL de tampon d'éluion par puit de la rangée F. Un peigne (protection des aimants) est également placé dans la rangée A.

Le tampon de lyse LB1 est réparti dans des microtubes de 2mL à raison de 100µL par tube (ou dans les puits de la rangée B de la plaque Deep Well). Sont ajoutés (par tube de 2 mL ou par puit de la rangée B de la plaque) la protéinase K (10µL) ainsi que les phages MS2 (5µL) et T4 ou PBS* (5µL) (il est possible de préparer extemporanément un mix contenant le tampon LB1, la protéinase K et les phages pour le nombre total d'échantillon). Un volume de 90µL d'échantillon (ECH) (broyat d'organes centrifugé ou surnageant de culture) est ensuite déposé dans chacun des tubes (ou des puits de la rangée B de la plaque). L'ensemble est mélangé (vortex léger ou homogénéisé à la pipette) puis incubé 15 minutes à température ambiante. Un tube « E+ » (contenant la matrice broyat d'organes dopée par du surnageant viral) est traité en parallèle. Un tube « E- » (contenant uniquement le tampon LB1, la protéinase K et 100µL de PBS) est également préparé.

Il est conseillé de préparer le tampon de capture extemporanément avant de lancer le programme. Préparer un mélange avec 600µL de tampon B2 et 13µL de billes magnétiques ADIAMAG Beads (bien mélanger la solution) par échantillon. Un volume de 600µL de ce tampon de capture est déposé dans chaque puit de la rangée B de la plaque.

Si la lyse des échantillons a été effectuée en microtubes de 2mL, la totalité du volume est transférée dans le puit contenant le tampon de capture de la rangée B de la plaque. En revanche, si la lyse a été effectuée dans la plaque, le tampon de capture est ajouté directement à l'échantillon. Une homogénéisation par pipetage est effectuée.

La plaque Deep Well est prête à être chargée dans l'automate. Le programme adapté est lancé selon les recommandations du fournisseur. En fin de programme, les acides nucléiques extraits (rangée F) sont transférés dans des tubes Eppendorf ou des barrettes et sont conservés comme indiqué ci-dessous.

Un schéma récapitulatif des différentes phases d'extraction des acides nucléiques est présenté en Annexe 2.

Les acides nucléiques extraits doivent être transférés à une température de 5°C ± 3°C et peuvent être soumis directement à la RT-rPCR. Ils doivent être conservés au froid négatif (≤-16°C ou ≤-65°C) pour une conservation de longue durée.

* Comme indiqué dans l'introduction, les laboratoires ne ciblant qu'exclusivement le virus à ARN vNHI, l'ajout de phage T4 (phage à ADN) est optionnel. Il conviendra au laboratoire de remplacer ce phage T4 par un volume équivalent de PBS.



8.3 Amplification par PCR

Toutes les exigences concernant l'amplification par PCR sont spécifiées dans la NF U 47-600-1.

8.3.1 Préparation des mélanges réactionnels de la PCR en temps réel.

La méthode est décrite pour un volume final de 25 µL par réaction de RT-rPCR en utilisant les réactifs répertoriés dans le Tableau 5. Un volume de 5 µL d'échantillon ou de témoins négatifs ou positifs est ajouté à 20 µL de mélange réactionnel.

La feuille de mix utilisée en routine est annexée à titre d'exemple à ce document (Annexe 3).

Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la RT-rPCR.

Réactif Concentration initiale	Détection vSHV		Détection MS2	
	Concentration finale	Volume par échantillon (µL)	Concentration finale	Volume par échantillon (µL)
2x Reaction Mix InVitrogen	1X	12,5	1X	12,5
SSIII RT / Platinum Taq Mix		0,50		0,50
Amorce F (20µM)	900nM	1,125	400nM	0,50
Amorce R (20µM)	900nM	1,125	400nM	0,50
Sonde (20µM)	250nM	0,31	100nM	0,125
Eau		4,44		5,875
Volume du mix :		20µL		20µL
Ajout échantillon (ECH)		5µL		5µL
Volume final		25µL		25µL

8.3.2 Échantillons

Chaque échantillon est testé en simplicat ou en duplicat à la convenance du laboratoire*, pour chacune des cibles vSHV et MS2. Le résultat de la cible vSHV (ECH_{vSHV}) correspond au statut de l'échantillon, et celui de la cible MS2 (ECH_{MS2}) au témoin de processus intrinsèque à l'échantillon. A minima, les valeurs de Ct minimales et maximales obtenues pour la cible MS2 de la série sont enregistrées dans une carte de contrôle (ECH_{MS2}) et permettent de valider le bon déroulement du processus de la série.

* Comme indiqué dans l'introduction, le LNR laisse la possibilité aux laboratoires utilisateurs de déposer les échantillons et témoins en simplicat ou duplicat (l'étude rétrospective sur plusieurs dizaines d'échantillons menée par le LNR a mis en évidence des écarts de Ct inférieurs à 1,5 entre 2 dépôts d'un duplicat).

8.3.3 Témoins

8.3.3.1 Témoin négatif de processus « E- »

A chaque séance d'extraction, un témoin négatif « E- » ne contenant ni l'organisme cible, ni les phages, est ajouté à la série. Il sert de témoin négatif de processus pour les cibles vSHV et MS2.



8.3.3.2 *Témoin positif de processus cible « E+ »*

A chaque séance d'extraction, un témoin positif « E+ » contenant l'organisme cible et les phages est ajouté à la série. Il sert de témoin positif de processus pour les cibles vSHV et MS2. Les valeurs de Ct obtenues pour les 2 cibles sont des valeurs de référence et sont enregistrées dans une carte de contrôle (E+v_{SHV} et E+_{MS2}).

8.3.3.3 *Témoin négatif de PCR (NTC)*

De l'eau exempte de RNase et DNase est utilisée en tant que témoin négatif (No Template Control ou NTC). Un volume de 5µL est déposé dans le mélange réactionnel.

8.3.3.4 *Témoin positif de PCR*

Un témoin positif de PCR (T_{amp}) est inséré à chaque série de RT-rPCR. (voir 5.4). Un volume de 5µL est déposé dans le mélange réactionnel. Les valeurs de Ct obtenues sont des valeurs de référence et sont enregistrées dans une carte de contrôle.

8.3.4 *Programme d'amplification RT-rPCR*

Le programme d'amplification (températures, durées) est décrit dans le Tableau 6 :

Tableau 6 : Programme d'amplification RT-rPCR pour les cibles vSHV et MS2

Transcription inverse	30 minutes à 50°C
Activation et dénaturation initiale	15 minutes à 95°C
Nombre de cycles (amplification)	40
Amplification	15 secondes à 94°C
	60 secondes à 60°C
	Mesure de la fluorescence FAM



9 Résultats

9.1 Calculs et expression des résultats

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel associé au thermocycleur utilisé, selon les recommandations des fournisseurs.

La ligne de seuil doit être positionnée de telle sorte qu'elle croise la courbe de fluorescence de chaque contrôle positif durant la phase d'accroissement exponentielle de l'amplification, généralement vers son milieu lorsque les valeurs de fluorescence sont représentées en échelle logarithmique.

Pour chaque signal observé et pour chacune des cibles, sont à prendre en considération les éléments suivants :

- L'absence ou la présence de courbes d'amplification ;
- Leurs aspects et leurs caractéristiques ;
- La cohérence entre les duplicats (sauf pour les dépôts en simplicité) (variation tolérée ≤ 1 Ct) ;
- Le nombre de cycles nécessaires pour que les fluorescences émises se distinguent du bruit de fond (valeurs de Ct) ;

9.2 Contrôle de la validité des résultats

Un arbre décisionnel résumant les modalités d'interprétation des résultats est présenté en Annexe 4.

9.2.1 Vérification des témoins

Les résultats des témoins analysés en parallèle des échantillons doivent être conformes aux résultats attendus selon le Tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7 : Résultats attendus des différents témoins

	Nom dans les documents selon la cible	Résultats attendus
Témoins de PCR	NTC_{vSHV} NTC_{MS2}	Absence d'amplification en vSHV Absence d'amplification en MS2
	Témoin positif de PCR (T_{amp})	Amplification en vSHV soumis à carte de contrôle
Témoins de processus	Témoin négatif de processus « E- »	Absence d'amplification en vSHV Absence d'amplification en MS2
	Témoin positif de processus « E+ »	Amplification en vSHV soumis à carte de contrôle Amplification en MS2 soumis à carte de contrôle
	Echantillon (ECH) : Témoin de processus intrinsèque à l'échantillon : ECH_{MS2}	Amplification en MS2 soumis à carte de contrôle (à minima valeurs minimales et maximales de la série)

Si certains contrôles ne sont pas validés, l'étape d'extraction et/ou d'amplification devra être répétée.



9.2.2 Analyse du statut des échantillons

Tous les contrôles doivent être validés (NTC, E-, E+vSHV, E+MS2 et T_{amp}) avant l'analyse du statut de l'échantillon. Les valeurs du témoin de processus intrinsèque à l'échantillon (ECH_{MS2}) doivent être conformes aux valeurs attendues. Le signal obtenu pour la cible vSHV est alors analysé, et la valeur du Ct obtenu est vérifiée.

Un signal tardif se définit par une valeur de Ct supérieure à celle du Ct correspondant à la LD_{méthode} alors qu'un signal précoce correspond à une valeur de Ct inférieure.

Plusieurs cas peuvent se présenter (Schéma décisionnel en Annexe 4) :

- ECH positifs en vSHV avec signal précoce : le virus est **défecté** dans l'échantillon, et cela, quelle que soit la valeur de l'ECH_{MS2} ;
- ECH positifs en vSHV avec signal tardif :
 - > si l'ECH_{MS2} est validé, alors le résultat est **ininterprétable**,
 - > si l'ECH_{MS2} n'est pas validé, il est nécessaire de refaire la RT-rPCR en diluant l'échantillon au 1/10^{ème} et/ou de refaire une extraction ;
- ECH négatifs en vSHV :
 - > si l'ECH_{MS2} est validé, alors le virus n'est **pas détecté** dans l'échantillon,
 - > si l'ECH_{MS2} n'est pas validé, il est nécessaire de refaire la RT-rPCR en diluant l'échantillon au 1/10^{ème} et/ou refaire une extraction.

Le résultat final pour la présence de génome de vSHV dans l'échantillon analysé est exprimé de l'une des façons suivantes :

- Virus responsable de la Septicémie Hémorragique Virale **non détecté** par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé ;
- Virus responsable de la Septicémie Hémorragique Virale **détecté** par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé ;
- Résultat **ininterprétable** pour la recherche du génome de vSHV par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé.



10 Caractéristiques de performance de la méthode

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE	
Titre de la méthode	Détection du virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) par RT-PCR en temps réel
Type de méthode	Méthode qualitative
Objectifs	Disposer d'une méthode qualitative de RT-PCR en temps réel permettant de détecter le vSHV et intégrant l'ensemble des contrôles qualité nécessaire pour assurer une fiabilité optimale.
Principe	Cette méthode est à appliquer pour la détection du vSHV. Cette méthode intègre des témoins positifs de processus cible et non cible externes exogènes permettant de contrôler le bon déroulement des étapes d'extraction et d'amplification.
Matrices testées	Broyat d'organes 10% P/V Surnageant de culture
Espèce animale	Toutes espèces piscicoles
Analytes	vSHV : gène N MS2 : gène de la réplicase
Témoin positif non cible externe exogène (CEE)	Phage MS2
Etapes de la méthode	Broyage d'organes ; Extraction d'acides nucléiques manuelle en colonnes avec membrane de silice, ou semi-automatisée avec des billes magnétiques ; Amplification par RT-PCR en temps réel
Documents de référence	Norme NF U 47-600-1 et 2 : Méthodes d'analyse en santé animale PCR
Méthodes de référence	Ninove <i>et al.</i> , 2011 Jonstrup <i>et al.</i> , 2013

ROBUSTESSE DE LA METHODE	
Paramètre impactant sur les résultats de la méthode	Le kit d'enzyme de RT-rPCR, ainsi que le thermocycleur (et/ou son logiciel d'interprétation) utilisés pour mettre en œuvre peuvent influencer sur les seuils de détection.
Paramètres non impactant sur les résultats de la méthode	<p>Test en 8 réplicats avec variation des paramètres sur les 2 matrices Surnageant de culture et Broyat d'organes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 kits d'extractions différents (kits en colonne) • $\pm 20\%$ concentration en amorces et sondes • $\pm 10\%$ volume de la prise essai • $\pm 2^\circ\text{C}$ sur l'ensemble des températures du thermoprogramme • 2 appareils de PCR temps réel différents <p>Le seuil de détection du vSHV n'est pas affecté par ces variations de paramètres.</p>



CRITÈRES DE PERFORMANCES DE LA PCR	
<u>Spécificité analytique</u>	<p><i>Résultats obtenus à partir d'un panel de 58 échantillons de vSHV regroupant l'ensemble des génotypes connus (génotypes I à IV incluant sous-groupes des génotypes I et IV) et 11 autres virus (63 échantillons au total) ont été inclus dans l'étude.</i></p> <p>Les tests d'inclusivité et d'exclusivité ont permis de montrer que la PCR est bien spécifique.</p>
<u>Limite de détection de la PCR : LD_{PCR}</u>	<p><i>Résultats obtenus lors de 3 séances de RT-rPCR, 8 réplicats par niveau de dilution</i></p> <p>La LD_{PCR} a été établie au niveau de dilution $1,25 \cdot 10^{-5}$ d'un ARN 07/71 de référence correspondant à environ 160 copies de transcrits /réaction.</p> <p>La LD_{PCR} a également été établie à partir de transcrit à 100 copies de transcrits / réaction de RT-rPCR.</p>
<u>Répétabilité de la PCR</u>	<p><i>Résultats obtenus lors de 3 séances de RT-rPCR par un opérateur, sur une gamme de dilution en duplicat</i></p> <p>Le coefficient de variation est <1,24% pour chacun des points de dilution.</p>
<u>Fidélité intermédiaire de la PCR</u>	<p><i>Résultats obtenus lors de 5 séances de RT-rPCR par 3 opérateurs, sur une gamme de dilution en duplicat</i></p> <p>Le coefficient de variation est <1,45% pour chacun des points de dilution.</p>






CRITÈRES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE COMPLÈTE	
<u>Sensibilité et spécificité diagnostique</u>	<p><i>Résultats obtenus à partir d'un panel de 58 échantillons de vSHV regroupant l'ensemble des 4 génotypes connus. 11 autres virus (63 échantillons au total) ont été inclus dans l'étude. Comparaison avec les résultats obtenus en culture cellulaire.</i></p> <p>Sensibilité : 100%</p> <p>Spécificité : 100%</p>
<u>Limite de détection de la méthode : LD_{méthode}</u>	<p><i>Résultats obtenus lors de 2 séances d'extraction suivies de RT-rPCR, 4 réplicats par niveau de dilution</i></p> <p>Kit en colonne (Macherey Nagel) : La LD_{méthode} a été établie à environ 20 DICT50/mL d'une production virale de la souche 07/71 de référence pour les matrices surnageants de culture et broyats d'organes.</p> <p>Kit en billes magnétiques (Bio-X diagnostics) : La LD_{méthode} a été établie à environ 5 DICT50/mL d'une production virale de la souche 07/71 de référence pour les matrices surnageants de culture et broyats d'organes</p>



Annexe 1

Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des acides nucléiques avec le kit NucléoSpin Virus (Macherey Nagel)

Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des acides nucléiques avec le kit NucléoSpin Virus (Macherey Nagel)

<p>1 Lyse des virus</p>	 <p>200µL VL 5µL Prot. K 5,6µL RNA carrier Echantillon : ✓ 180µL + 10µL MS2 + 10µL T4 ou PBS (Témoins processus non-cible)</p> <p>Mix 15 min à 70°C Centrifugation rapide</p>
<p>2 Ajustement des conditions de salinité</p>	 <p>200µL Ethanol</p> <p>Mix</p> <p>5 min à temp. ambiante Centrifugation rapide</p>
<p>3 Fixation des ARN et ADN viraux</p>	 <p>Déposer l'échantillon (env. 610µL)</p> <p>Centrifugation : 4000g 3min</p>
<p>4 Lavage et séchage de la membrane de silice</p> <p>1^{er} et 2^{ème} lavage :</p> <p>3^{ème} lavage :</p> <p>Séchage :</p>	 <p>400µL VW1 400µL VW2 200µL VW2</p> <p>Centrifugation : 11000g 30sec</p> <p>20000g 5min</p> <p>56°C, 5min avec bouchons ouverts</p>
<p>5 Élution des ARN et ADN viraux</p>	 <p>Eau « Rnase free » (70°C) ✓ 200µL</p> <p>3 min à temp. ambiante</p> <p>20000g 3min</p>



Annexe 2

Schéma récapitulatif des étapes du protocole d'extraction des acides nucléiques sur KingFisher DuoPrime avec le kit « ADIAMAG » (Bio-X Diagnostic) et une plaque DeepWell (DW96) (selon les recommandations du fournisseur)

- Lyse des échantillons : 100µl LB1 + 10µl PK + 5µl MS2 + 5µl T4
- Préparation tampon de capture (sur la base de 600µl B2 + 13µl beads)

Distribution des réactifs /
puits :

600µL tampon de capture
(600µl B2 + 13µL beads)

350µL W3

350µL W4

350µL Ethanol 80%

100µL E6

A
B
C
D
E
F
G
H

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Plaque DW96

Etapes :

Peigne

Echantillons lysés dans tampon LB1 +
protéinase K

1^{er} lavage

2^{ème} lavage

3^{ème} lavage

Elution et récupération des échantillons



Annexe 3

Feuille de préparation du mix de RT-rPCR pour la détection du vSHV, du vNHI et du témoin positif de processus non-cible (phage MS2)

vNHI / vSHV + phage MS2

PCR TEMPS REEL One Step RT-PCR InVitrogen

N° Diagno:	Date :	Manipulateur:																																														
<table border="1"> <tr> <th colspan="2">Paramètres de la PCR</th> <th colspan="3">Concentrations finales:</th> <th>Genes cibles:</th> </tr> <tr> <td>Volume réactionnel</td> <td>25</td> <td>[] finale amorceF</td> <td>900</td> <td>900</td> <td>400</td> <td>nM</td> <td>NHI, gène N (Purcell 2013)</td> </tr> <tr> <td>Volume de la prise d'essai</td> <td>5</td> <td>[] finale amorceR</td> <td>900</td> <td>900</td> <td>400</td> <td>nM</td> <td>SHV, gène N (Jonstrup 2013)</td> </tr> <tr> <td>[] Milieu Réactionnel</td> <td>2</td> <td>[] finale sonde</td> <td>200</td> <td>250</td> <td>100</td> <td>nM</td> <td>phage MS2 (Ninove 2011)</td> </tr> <tr> <td>[] Solution-mère amorces</td> <td>20</td> <td>Fluorophore:</td> <td>FAM</td> <td>FAM</td> <td>FAM</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>[] Solution-mère sonde</td> <td>20</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			Paramètres de la PCR		Concentrations finales:			Genes cibles:	Volume réactionnel	25	[] finale amorceF	900	900	400	nM	NHI, gène N (Purcell 2013)	Volume de la prise d'essai	5	[] finale amorceR	900	900	400	nM	SHV, gène N (Jonstrup 2013)	[] Milieu Réactionnel	2	[] finale sonde	200	250	100	nM	phage MS2 (Ninove 2011)	[] Solution-mère amorces	20	Fluorophore:	FAM	FAM	FAM			[] Solution-mère sonde	20						
Paramètres de la PCR		Concentrations finales:			Genes cibles:																																											
Volume réactionnel	25	[] finale amorceF	900	900	400	nM	NHI, gène N (Purcell 2013)																																									
Volume de la prise d'essai	5	[] finale amorceR	900	900	400	nM	SHV, gène N (Jonstrup 2013)																																									
[] Milieu Réactionnel	2	[] finale sonde	200	250	100	nM	phage MS2 (Ninove 2011)																																									
[] Solution-mère amorces	20	Fluorophore:	FAM	FAM	FAM																																											
[] Solution-mère sonde	20																																															

Préparation du MasterMix (Pièce 28) Kit: InVitrogen Superscript III One-step RT-qPCR system

Réactifs	Volume pour 1 réaction	NHI	SHV	MS2
		1 réactions	1 réactions	1 réactions
InVitrogen MM	12,50	12,50	12,50	12,50
oPVP 377	1,13	1,13		
oPVP 378	1,13	1,13		
taPVP 23	0,25	0,25		
oPVP 224	1,13		1,13	
oPVP 225	1,13		1,13	
taPVP 6	0,31		0,31	
oPVP 446	0,50			0,50
oPVP 447	0,50			0,50
taPVP 25	0,13			0,13
INV RT mix	0,50	0,50	0,50	0,50
H ₂ O		4,50	4,44	5,88
Volume total (µl)		20,00	20,00	20,00
Ajouter	5 µl ADN à	20 µl Mix	20 µl Mix	20 µl Mix

Déposés échantillons (pièce 4a)

Témoins PCR:		trPVP1	trPVP2								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

Conditions de PCR (pièce 4)

Programme:

- 30 min 50°
- 15 min 95°
- 15 sec 94°
- 60 sec 60°
mesure FAM
- retour 3. 39x

Appareil PCR:

Biorad (Biorad 29001/08/011)

Applied (29001/17/011)

Validation et Résultats

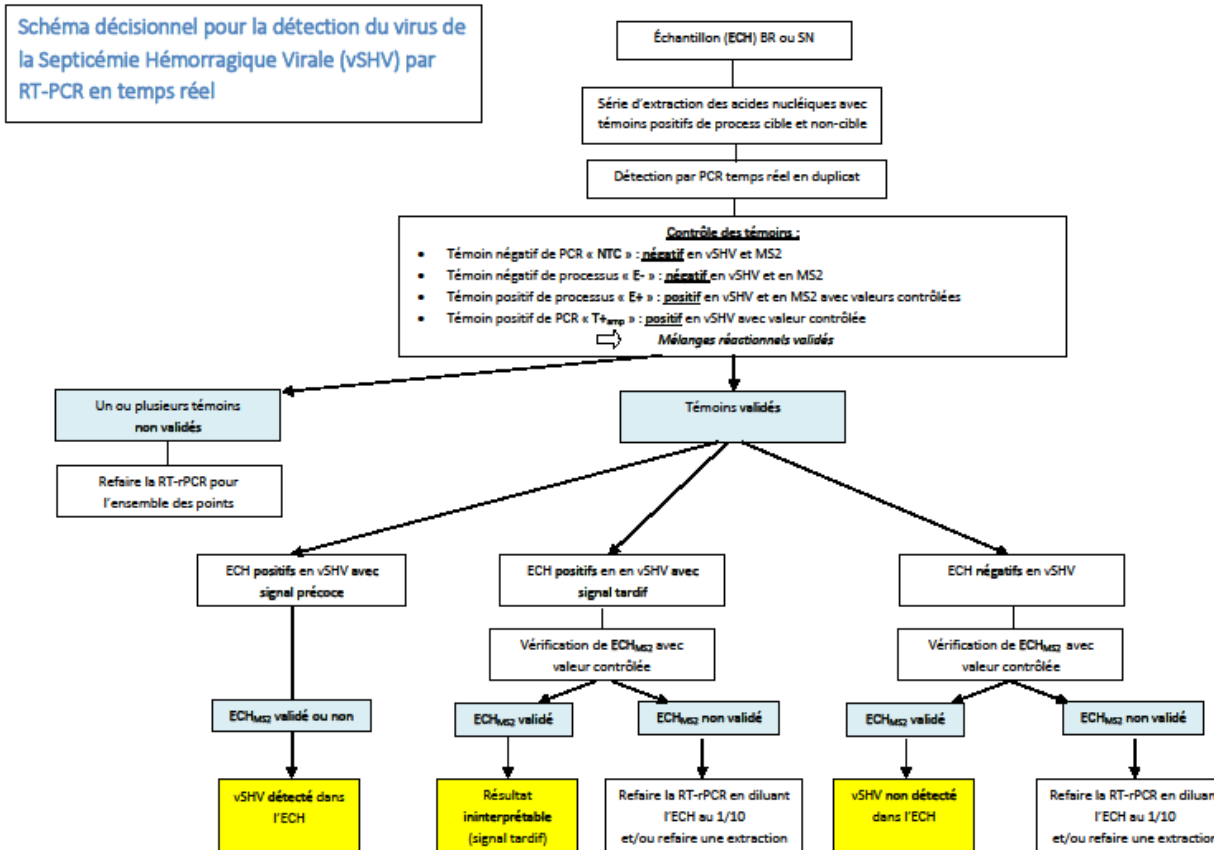
voir ENR1138 : NHI SHV MS2 E+

voir RES010

Enregistrement fichier: (nom dossier/nom fichier)



Annexe 4





Bibliographie

- ANSES. 2019. ANSES/PLOU/MA/3 : Méthode d'analyse en santé animale « Détection du virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse par RT-PCR temps réel. ». [En ligne]; (Consulté le 26/03/2019). https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_PLOU_MA_3_rev04.pdf
- ATCC. 2015. Echerichia coli bacteriophage T4 (ATCC® 11303-B40™). [En ligne]; (Consulté le 26/03/2019). <https://www.lgcstandards-atcc.org/~ps/11303-B40.ashx>
- ATCC. 2016. Echerichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™). [En ligne]; (Consulté le 26/03/2019). <https://www.atcc.org/~ps/15597-B1.ashx>
- Jonstrup, S.P., Kahns, S., Skall, H.F., Boutrup, T.S. and Olesen, N.J. 2013. Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J Fish Dis* 36, 9-23.
- Ninove, L., Nougairede, A., Gazin, C., Thirion, L., Delogu, I., Zandotti, C., Charrel, R.N. and De Lamballerie, X. 2011. RNA and DNA bacteriophages as molecular diagnosis controls in clinical virology: a comprehensive study of more than 45,000 routine PCR tests. *PLoS One* 6, e16142.
- OIE. 2019. Chapitre 1.3 : Maladies listées par l'OIE. In, *Code sanitaire pour les animaux aquatiques (2019)*, [En ligne] (Consulté le 15/11/2019) http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/aahc/current/chapitre_diseases_listed.pdf

Textes réglementaires

- Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales. Version consolidée au 16 mars 2017.
- Décision d'exécution (UE) 2015/1554 de la commission du 11 septembre 2015 portant modalités d'application de la directive 2006/88/CE en ce qui concerne les exigences relatives à la surveillance et aux méthodes de diagnostic.
- Directive 2006/88/CE de conseil du 24 octobre 2006 relative aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture, et relative à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies.
- NF U47-600-1 : « Méthodes d'analyse en santé animale PCR : exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale » (version 2015-02-F).
- NF U47-600-2 : « Méthodes d'analyse en santé animale – PCR – Partie 2 : exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale » (version 2015-02-P).
- NF EN ISO 10705-1 Octobre 2001 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 1 : dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques.