

Méthode d'analyse en santé animale

RÉFÉRENCE : ANSES/PPN/MA/8/Rev00

Ref ennov : PPN/INS/0951

Avril 2024

Détection du virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon (vAIS) 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
V01	Création	Avril 2024	Version initiale

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 Virologie, Immunologie et Ecotoxicologie des Poissons (VIMEP)

CS 10070 – Site Ifremer

29280 PLOUZANÉ

Contact : 02 98 22 44 62

Adresse mail : lnr.poissons@anses.fr

Edition de consultation



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-qPCR 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 Kit 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-qPCR.....	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-qPCR.....	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	16
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-qPCR	18
9	Résultats	18
9.1	Calculs et expression des résultats.....	18
9.2	Contrôle de la validité des résultats.....	18
9.2.1	Vérification des témoins	19
9.2.2	Analyse du statut des échantillons	19
10	Caractéristiques de performance de la méthode	21
Annexe 1	23
Annexe 2	24
Annexe 3	25
Annexe 4	26
Bibliographie	27
Textes règlementaires	27

Table des figures

Figure 1: Stratégie de diagnostic du vAIS par RT-qPCR à partir de surnageant 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-qPCR.....	12
Tableau 4 : Description des amorces et sondes	12
Tableau 5 : Composition des mélanges réactionnels pour la RT-qPCR.....	17
Tableau 6 : Programme d'amplification RT-qPCR pour les cibles vAIS et MS2.....	18
Tableau 7 : Résultats attendus des différents témoins	19

Introduction

Le virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon (vAIS), qui appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*, et au genre *Isavirus* peut être responsable de très importantes mortalités sur saumon atlantique (*Salmo salar*), induisant des symptômes de type anémie sévère et hémorragies de plusieurs organes. Ce virus peut également être isolé à partir de truites fario (*Salmo trutta*), et de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (espèces sensibles listées par l'OMSA et par l'Union Européenne (UE, 2024)). Il fait l'objet d'une inscription sur la liste des maladies aquatiques de l'OMSA (Code Sanitaire pour les animaux aquatiques, chapitre 1.3., 2022) (WOAH, 2022a) et est réglementé par l'Union Européenne (Loi de Santé Animale règlement 2016/429, catégorie C+D+E telle que spécifié dans le règlement 2018/1882 (UE, 2018)). Le vAIS est un virus à ARN négatif, au génome segmenté (8 segments), codant au moins 10 protéines. Le segment 6, qui code l'hémagglutinine estérase (HE), contient une zone hautement polymorphique (HPR : highly polymorphic region). Cette région est caractérisée par la présence de délétions larges (gaps). Le vAIS circule sous sa forme HPRO, forme ne présentant pas de délétions dans cette région et non pathogène, ou HPR-deleted (HPRΔ) – présentant des délétions, pathogène. Le virus est présent au Canada, aux Etats-Unis, en Islande et sur le continent Européen, notamment en Norvège, aux îles Féroé et en Ecosse. La France est reconnue indemne de ce virus. Comme indiqué dans le manuel aquatique de l'OMSA chapitre 2.3.4 (WOAH, 2022b), diverses méthodes de diagnostic sont disponibles. Néanmoins, dans le cadre d'opérations de surveillance de populations apparemment saines, seules les méthodes de PCR en temps réel et conventionnelles sont recommandées. Dans le cadre de la confirmation de suspicions d'AIS, il convient de réaliser, en complément des méthodes de détection, un séquençage permettant de discriminer les souches HPR-deleted (pathogènes) des souches HPRO (non-pathogènes), tel qu'indiqué dans le manuel du LRUE, selon la méthode décrite par l'OMSA (EURL, 2022). Depuis 2016 et l'évolution de la réglementation européenne (Décision d'exécution UE 2015/1554) ayant rendu les techniques moléculaires de RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) ciblant les virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) et de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) officielles, l'unité VIMEP a réalisé un travail de développement, d'optimisation et de validation de méthodes avec l'objectif de pouvoir transmettre, à moyen terme, ces techniques aux laboratoires agréés du réseau national de surveillance. L'unité VIMEP a ainsi développé deux méthodes « One step » qualitatives de diagnostic par PCR en temps réel spécifiques du vNHI et du vSHV selon les recommandations émises par le LRUE dans son manuel de diagnostic. Afin de se conformer aux recommandations de la norme 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 », les méthodes ont été développées en utilisant des bactériophages (un phage à ARN (MS2) et un phage à ADN (T4)) comme contrôle de processus non cible exogène (Ninove *et al.*, 2011) permettant de garantir la qualité des étapes d'extraction et d'amplification. Ces méthodes comprennent également un témoin de processus cible E+, constitué de broyat d'organes dopé avec du surnageant de culture positif des virus classiquement recherchés dans le cadre des contrôles sanitaires officiels, à savoir les vNHI, vSHV et le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (vNPI). L'unité VIMEP est accréditée pour la méthode ciblant le vSHV depuis janvier 2020 (ANSES/PLOU/MA/4 (ANSES, 2020)) et le vNHI depuis février 2023 (ANSES/PPN/MA/7 (ANSES, 2023)).

Concernant le vAIS, l'unité VIMEP a porté ses efforts de développement en se basant sur la technique de RT-qPCR spécifique publiée par Snow *et al.* (2006) recommandée dans le manuel de diagnostic du LRUE. Un panel d'échantillon de vAIS reçu du laboratoire norvégien de référence (Norwegian Veterinary Institute (NVI)) a été utilisé pour la validation de la méthode. Des échantillons français (ou

plus généralement européens), considérés comme non porteurs du virus puisque la France (et la plupart des pays européens) est indemne, ont servi pour tester l'exclusivité. Cette méthode a été développée en suivant le processus employé pour les méthodes internes de RT-qPCR ciblant le vNHI et le vSHV en intégrant un contrôle de la qualité des étapes d'extraction et d'amplification au cours des analyses.

Remarque : Pour les laboratoires qui ne souhaitent réaliser qu'une recherche de vAIS 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.

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 vAIS est un virus à ARN simple brin (environ 13,5 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 vAIS par RT-qPCR 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).

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) ;

Snow *et al.* (2006): Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*)

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-qPCR : RT-PCR en temps réel

SVF : Sérum de Veau Fœtal

vAIS : Virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon

vNHI : Virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse

vNPI : Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse

vSHV : Virus de la Septicémie Hémorragique Virale

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_{vAIS} 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_{vAIS} E_{MS2}
Témoin négatif de PCR	<ul style="list-style-type: none"> NTC_{vAIS} NTC_{MS2}
Témoin positif de PCR	<ul style="list-style-type: none"> Témoin positif d'amplification PCR T_{vAIS}

4 Principe de la méthode

La méthode s'appuie sur le manuel de diagnostic publié par le Laboratoire Européen de Référence (EURL, 2022) et comprend les étapes consécutives suivantes :

- 1) Broyage des organes de poissons - en cas d'analyse directe ;
- 2) Extraction des acides nucléiques en intégrant le témoin positif de processus non-cible. Cette étape a été validée avec un kit semi automatisé avec billes magnétiques et un kit en colonne de silice ;
- 3) Amplification et détection d'une partie du segment 8 du vAIS et d'une partie du gène de la réplicase du phage MS2 par RT-qPCR.

Elle a été validée pour la matrice surnageant de broyat d'organes (BR) à 10% P/V.

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.

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-qPCR), 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-qPCR et détection

Deux amplifications distinctes (RT-qPCR simplex) sont prévues (voir 5.3) :

- L'une amplifie un fragment de 104pb dans le segment 8 du vAIS ;
- L'autre amplifie un fragment de 101pb dans le gène de la réplicase du phage MS2. Le vAIS étant un virus à ARN, la détection du phage T4 n'est pas nécessaire.

Cette étape est détaillée dans le paragraphe 8.3.

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

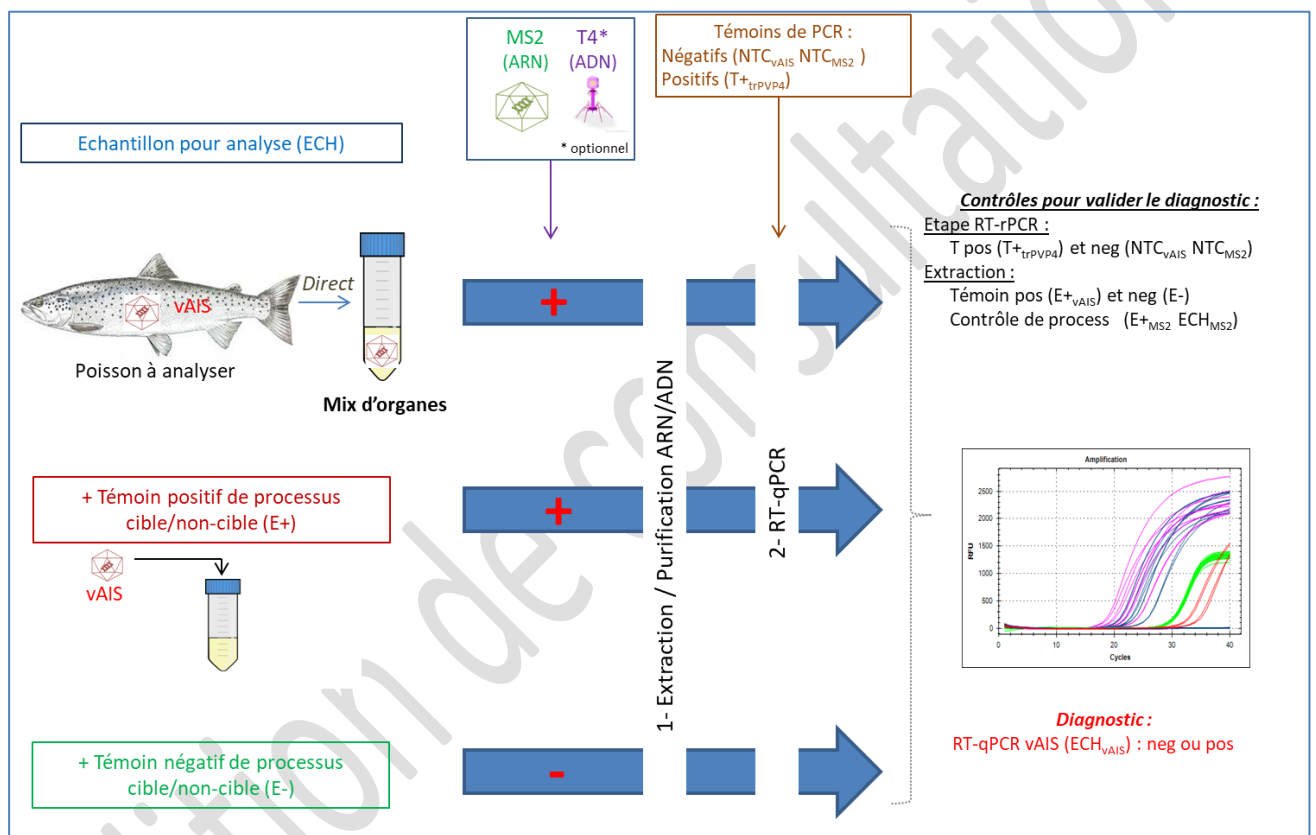


Figure 1: Stratégie de diagnostic du vAIS par RT-qPCR à partir de surnageant de broyat d'organes, en incluant l'ensemble des contrôles qualité.

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.

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

5.2 Extraction des acides nucléiques

5.2.1 Kit d'extraction

La référence du kit d'extraction utilisé au laboratoire est détaillée 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 / Adiaigène	NADI003	200 réactions
			NADI003-XL	800 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-qPCR.

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+_{VAIS}) est intégré à chaque séance d'extraction. Ce témoin est constitué de la matrice broyat d'organes sains dopée par une quantité de surnageant de culture de vAIS (souche norvégienne HPRΔ 2022-70-326-1) comprise entre 1 et 10 fois la limite de détection de la méthode (LD_{méthode}).

Afin de pouvoir être utilisé pour d'autres systèmes RT-qPCR, le témoin « E+ » peut également contenir des quantités équivalentes de surnageant de culture du virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) et du virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV).

5.3 Réactifs pour la RT-qPCR

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-qPCR

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 vNPI 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
vAIS	oPVP958	CTACACAGCAGGATGCAGATGT	50	22	104 pb	Snow <i>et al.</i> , 2006	Seg8 upstream
	oPVP959	CAGGATGCCGGAAGTCGAT	58	19			Seg8 downstream
	tqPVP43	FAM -CATCGTCGCTGCAGTTC - MGBNFQ	59	17			Seg8 Probe
MS2	oPVP446	CTCTGAGAGCGGCTCTATTGGT	54	22	101 pb	Ninove <i>et al.</i> , 2011	MS2F
	oPVP447	GTTCCCTACAACGAGCCTAAATTC	46	24			MS2R
	tqPVP25	[FAM] TCAGACACGCGTCCGCTATAACGA [BHQ1]	56	25			MS2probe

5.4 Témoin positif de PCR

Un ARN (synthétique ou extrait à partir d'un surnageant de culture positif en vAIS) appelé « T+_{VAIS} », calibré à environ 10 LD_{PCR} 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 ≤ -65°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 5 μ L et 1000 μ L ;
- 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 5 μ L et 1000 μ L ;
- Microtubes d'une capacité de 1,5 et 2mL ;
- Mélangeur de type vortex ;
- Centrifugeuse pour des microtubes de 1,5 et 2mL.
- 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-qPCR

- Micropipettes et pointes à filtres, d'une capacité comprise entre 5 μ L et 1000 μ L ;
- Distributeur pouvant délivrer des volumes de 20 μ L ;
- Tubes pour centrifugeuse, d'une capacité de 1,5 et 2mL ;
- 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 $\pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Logiciel de détection et d'analyse approprié.

7 Échantillons

7.1 Modalités d'échantillonnage et de transfert des échantillons

Comme indiqué dans le règlement UE 2020/689, elles suivent les recommandations de la méthodes et procédure de diagnostic du vAIS publiée par le LRUE (<https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals/isa>), notamment concernant les tissus à prélever, qui ont été retranscrites en français ci-dessous :

Avant expédition ou transfert au laboratoire, les morceaux d'organes à examiner sont prélevés sur le poisson à l'aide d'outils de dissection stériles et transférés dans des tubes en plastique stériles contenant un milieu de transport. Les tissus/leur quantité doivent être adaptés à l'examen virologique sur culture cellulaire et à la RT-PCR temps réel et sont fonction de la taille des poissons. Lors de l'échantillonnage de poissons dont la taille est trop petite pour permettre la dissection de tissus individuels, les viscères, y compris les reins, doivent être prélevés ou les poissons entiers homogénéisés après enlèvement du corps derrière le pore anal. Pour les poissons de plus grande taille, le rein antérieur, la rate et le cœur, ainsi que le liquide ovarien et séminal des géniteurs au moment de la reproduction doivent être échantillonnés. Le liquide ovarien ou séminal ou les morceaux d'organes d'un maximum de 5 poissons peuvent être collectés dans un tube stérile contenant au moins 4 ml de milieu de transport et représenter un échantillon groupé. Le tissu de chaque échantillon doit peser au minimum 0,5 gramme (g).

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 (dans ce dernier cas, les tissus ne doivent être congelés et décongelés qu'une seule fois avant l'examen).

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

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 billes 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'élution 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) 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 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et peuvent être soumis directement à la RT-qPCR. Ils doivent être conservés au froid négatif ($\leq -16^{\circ}\text{C}$ ou $\leq -65^{\circ}\text{C}$) pour une conservation de longue durée.

* Comme indiqué dans l'introduction, les laboratoires ne ciblant qu'exclusivement le virus à ARN vAIS, 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-qPCR en utilisant les réactifs répertoriés dans le Tableau 5. Un volume de 5 µL d'échantillon, ou de témoins négatifs ou positifs, ainsi que 20 µL de mélange réactionnel, sont déposés dans chaque puits.

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-qPCR.

Réactif Concentration initiale	Détection vAIS		Détection MS2	
	Concentration finale	Volume par échantillon (µL)	Concentration finale	Volume par échantillon (µL)
2x Reaction Mix InVitrogen	1X	12,50	1X	12,50
SSIII RT / Platinum Taq Mix		0,50		0,50
Amorce F (20µM)	900nM	1,13	400nM	0,50
Amorce R (20µM)	900nM	1,13	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 vAIS et MS2. Le résultat de la cible vAIS (ECH_{vAIS}) 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.

* 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 vAIS et MS2.

8.3.3.2 Témoin positif de processus cible « E+ »

A chaque séance d'extraction, un témoin positif « E+_{vAIS} » contenant l'organisme cible et les phages est ajouté à la série. Il sert de témoin positif de processus pour les cibles vAIS 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+_{vAIS} et E+_{MS2}).

8.3.3.3 *Témoign 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 *Témoign positif de PCR*

Le témoin positif de PCR (T_{AIS}) est inséré à chaque série de RT-qPCR. (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-qPCR*

Le programme d'amplification (températures, durées) est décrit dans le Tableau 6. Ce programme est le même que celui utilisé pour les amplifications des virus vNHI, vSHV et vNPI par les méthodes ANSES.

Tableau 6 : Programme d'amplification RT-qPCR pour les cibles vAIS 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 le milieu de la zone de linéarité 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 2.

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 _{vAIS}	Absence d'amplification en vAIS
	NTC _{MS2}	Absence d'amplification en MS2
	Témoin positif de PCR (T _{+AIS})	Amplification en vAIS soumis à carte de contrôle
Témoins de processus	Témoin négatif de processus « E- »	Absence d'amplification en vAIS Absence d'amplification en MS2
	Témoin positif de processus « E+ »	Amplification en vAIS 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_{vAIS}, E_{MS2} et T_{+AIS}) 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 vAIS 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 2) :

- ECH positifs en vAIS avec signal précoce : le virus est **détecté** dans l'échantillon, et cela, quelle que soit la valeur de l'ECH_{MS2} ;
- ECH positifs en vAIS 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-qPCR en diluant l'échantillon au 1/10^{ème} et/ou de refaire une extraction ;
- ECH négatifs en vAIS :
 - > 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-qPCR en diluant l'échantillon au 1/10^{ème} et/ou refaire une extraction.

Remarque :



En cas de détection de virus par RT-qPCR, et aussi en cas de détection de signal atypique, une RT-cPCR doit être effectuée afin de confirmer et de caractériser l'échantillon (HPR0 ou HPRΔ).

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

- Virus responsable de l'Anémie Infectieuse du Saumon **non détecté** par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé ;
- Virus responsable de l'Anémie Infectieuse du Saumon **détecté** par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé ;
- Résultat **ininterprétable** pour la recherche du génome du virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon par RT-PCR temps réel dans l'échantillon analysé.

Edition de consultation

10 Caractéristiques de performance de la méthode

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE	
Titre de la méthode	Détection du virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon (vAIS) par RT-PCR en temps réel.
Type de méthode	Méthode qualitative
Principe	Cette méthode est à appliquer pour la détection du vAIS. Cette méthode intègre un témoin positif de processus non cible externe exogène (phages) permettant de contrôler les étapes d'extraction et d'amplification.
Matrice testée	Broyat d'organes 10% P/V
Espèce animale	Toutes espèces piscicoles.
Analytes	vAIS : segment 8 Phage MS2 : gène de la réplicase
Témoin positif de processus non cible externe exogène	Phage MS2
Témoin positif cible de PCR NEDs PCR	Transcrit produit à partir d'une souche de vAIS HPRΔ (souche de référence « Glesvaer ») calibré à 3x LD _{PCR} (pour le NED) et entre 3 et 10x LD _{PCR} pour le T+
Etapas de la méthode	Broyage d'organes ; Extraction d'acides nucléiques par colonne de silice (kit NucleoSpin® Virus) ou méthode automatisée (kit Adiamag) ; Amplification par RT-PCR en temps réel.
Objectifs	Disposer d'une méthode qualitative rapide et fiable (intégration de contrôles qualité adaptés) de RT-PCR en temps réel permettant de détecter du génome de vAIS avec un niveau de sensibilité comparable à la méthode de RT-PCR conventionnelle, et facilement transférable aux laboratoires.
Documents de référence	Norme NF U 47-600-1 et 2 : Méthodes d'analyse en santé animale PCR.
Méthodes de référence	Snow <i>et al.</i> (2006) Ninove <i>et al.</i> , 2011

CRITÈRES DE PERFORMANCES DE LA PCR	
Limite de détection de la PCR <u>LD_{PCR}</u>	Résultats obtenus lors de 3 séances de RT-qPCR, 8 répliquats par niveau de dilution : La LD _{PCR} a été établie à la quantité de 2,5.10 ⁴ copies de transcrit trPVP4 par réaction PCR

CRITÈRES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE COMPLÈTE
--

<p><u>Sensibilité et spécificité diagnostique</u></p>	<p>Résultats obtenus à partir d'un panel de 29 échantillons de vAIS HPRΔ et HPRO, 24 autres virus ou échantillons négatifs ont été inclus dans l'étude.</p> <p>Echantillons de statuts connus (vAIS+ = provenance du laboratoire de référence norvégien, et vAIS- = provenant de pays indemnes de virus (dont la France)</p> <p>Sensibilité : 100%</p> <p>Spécificité : 100%</p>
<p><u>Limite de détection de la méthode</u></p> <p><u>LD_{méthode}</u></p>	<p>Résultats obtenus lors de 6 séances d'extraction suivies de RT-qPCR, 4 réplicats par niveau de dilution pour 2 approches différentes (dopage avec transcrit et avec surnageant de culture), avec 2 kits d'extraction et sur 2 appareils PCR (uniquement pour le dopage transcrit) :</p> <p>La LD_{méthode} a été établie à une quantité de $2,5 \times 10^5$ copies de transcrit par réaction pour les surnageants de broyats d'organes.</p>










CRITÈRES DE ROBUSTESSE DE LA PCR

<p><u>Variation de $\pm 20\%$ d'amorces et sondes</u></p>	<p>Résultats obtenus à partir d'une amplification en 4 réplicats du NED_{PCR} 1X en faisant varier les concentrations en amorces et sonde de $\pm 20\%$ comparé à la condition normale.</p> <p>Détection de 12/12 réplicats, avec un Ct moyen de $32,74 \pm 0,20$ et un CV de 0,60</p>
<p><u>Variation de $\pm 10\%$ de la prise d'essai</u></p>	<p>Résultats obtenus à partir d'une amplification en 4 réplicats du NED_{PCR} 1X en faisant varier la prise d'essai de $\pm 10\%$ comparé à la condition normale.</p> <p>Détection de 12/12 réplicats, avec un Ct moyen de $32,84 \pm 0,32$ et un CV de 0,96</p>
<p><u>Variation de $\pm 2^\circ\text{C}$ des températures du thermogramme</u></p>	<p>Résultats obtenus à partir d'une amplification en 4 réplicats du NED_{PCR} 1X en faisant varier le thermogramme de $\pm 2^\circ\text{C}$ comparé à la condition normale.</p> <p>Détection de 12/12 réplicats, avec un Ct moyen de $32,63 \pm 0,49$ et un CV de 1,49</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 / puit :

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-qPCR pour la détection du vAIS et du témoin positif de processus non-cible (phage MS2)

vAIS + phage MS2

PCR TEMPS REEL One Step RT-PCR InVitrogen

N° Diagno: _____ Date : _____ Manipulateur: _____

Paramètres de la PCR		Concentrations finales:		Genes cibles:	
Volume réactionnel	25 µl	[] finale amorcéF	900 nM	AIS, segment 8 (Snow 2006)	
Volume de la prise d'essai	5 µl	[] finale amorcéR	400 nM	phage MS2 (Ninove 2011)	
[] Milieu Réactionel	2 x	[] finale sonde	250 nM		
[] Solution-mère amorces	20 µM		100 nM		
[] Solution-mère sonde	20 µM	Fluorophore :	FAM FAM		

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

Réactifs	Volume pour 1 réaction	AIS réactions	MS2 réactions
InVitrogen MM	12,50	12,50	12,50
oPVP 958	1,13	1,13	
oPVP 959	1,13	1,13	
tgPVP 43	0,31	0,31	
oPVP 446	0,50		0,50
oPVP 447	0,50		0,50
tgPVP 25	0,13		0,13
Inv RT mix	0,50	0,50	0,50
H ₂ O		4,44	5,88

Volume total (µl)	20,00	20,00
Ajouter 5 µl ADN à	20 µl Mix	20 µl Mix

Dépôts échantillons (pièce 4a)

Témoins PCR: _____

	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:

1.	30 min	50°
2.	15 min	95°
3.	15 sec	94°
4.	60 sec	60°
		mesure FAM
5.	retour 3.	39x

Appareil PCR:

<input type="checkbox"/>	Biorad CFX
<input type="checkbox"/>	Applied QS5

Validation et Résultats

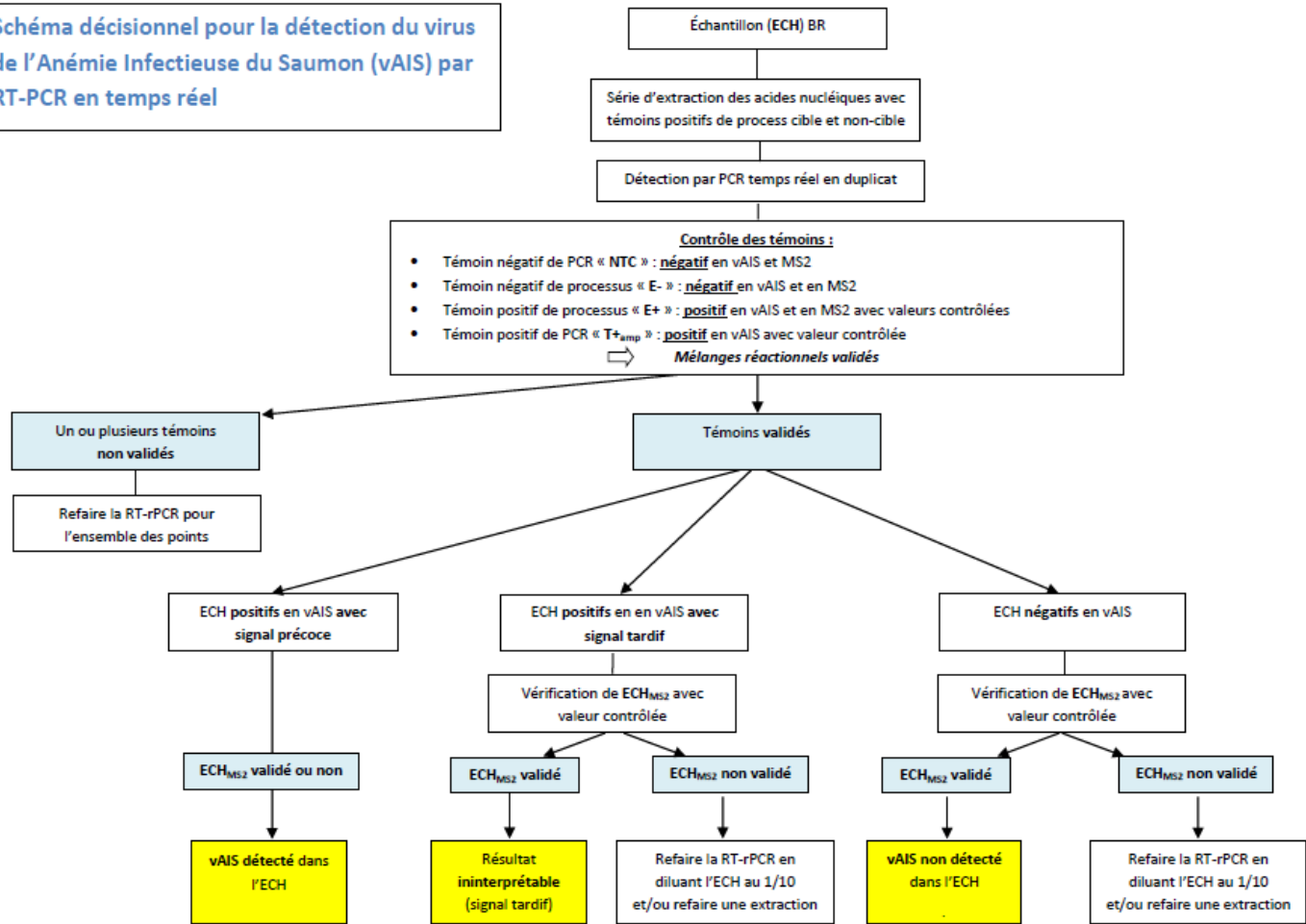
voir ENR1138 : AIS MS2 E+

voir RES010

Enregistrement fichier: (nom dossier/nom fichier)

Annexe 4

Schéma décisionnel pour la détection du virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon (vAIS) par RT-PCR en temps réel



Bibliographie

- ANSES. 2020. ANSES/PLOU/MA/4 : Détection du virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) par RT-PCR en temps réel - Révision 04. [En ligne]
https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_PLOU_MA_4_rev04.pdf
- ANSES. 2023. ANSES/PPN/MA/7 : Détection du virus de la Nécrose Hématopoiétique Infectieuse (vNHI) par RT-PCR en temps réel - "Hoferer" - Révision 01. [En ligne]
https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_PPN_MA_7_rev01.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>
- EURL. 2022. Diagnostic methods for the surveillance and confirmation of infection with hpr-deleted infectious salmon anemia virus (isav). [En ligne]
<https://www.eurl-fish-crustacean.eu/fish/diagnostic-manuals/isa>
- 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, doi:
- Snow, M., McKay, P., McBeath, A.J., Black, J., Doig, F., Kerr, R., Cunningham, C.O., Nylund, A. and Devold, M. 2006. Development, application and validation of a Taqman real-time RT-PCR assay for the detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev Biol (Basel)* 126, 133-45; discussion 325-6, doi:
- UE. 2018. RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2018/1882 DE LA COMMISSION du 3 décembre 2018 sur l'application de certaines dispositions en matière de prévention et de lutte contre les maladies à des catégories de maladies répertoriées et établissant une liste des espèces et des groupes d'espèces qui présentent un risque considérable du point de vue de la propagation de ces maladies répertoriées [En ligne]
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1882&from=EN>
- UE. 2024. RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2024/216 DE LA COMMISSION du 11 janvier 2024 modifiant l'annexe du règlement d'exécution (UE) 2018/1882 en ce qui concerne les maladies répertoriées d'animaux aquatiques et la liste des espèces et groupes d'espèces présentant un risque considérable du point de vue de la propagation de ces maladies répertoriées. [En ligne]
https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202400216
- WOAH. 2022a. Code sanitaire pour les animaux aquatiques - Maladies listées par l'OMSA. [En ligne]
https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/codes-et-manuels/acces-en-ligne-au-code-aquatique/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_diseases_listed.htm
- WOAH. 2022b. Manuel aquatique - Infection with hpr-deleted or hpr0 Infectious Salmon Anaemia Virus. [En ligne]
https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/aahm/current/2.3.04_ISA.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.

RÈGLEMENT (UE) 2016/429 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 9 mars 2016 relatif aux maladies animales transmissibles et modifiant et abrogeant certains actes dans le domaine de la santé animale (« législation sur la santé animale »)

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.

Textes abrogés

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.

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.

Edition de consultation