



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

CONCENTRATION DES NOROVIRUS DE GÉNOGROUPE I ET II PROVENANT D'HUÎTRES CONTAMINÉES
ET DÉTECTION DE CES VIRUS AU MOYEN DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE-AMPLIFICATION EN CHAÎNE DE
LA POLYMÉRISE

Yvon-Louis Trottier¹, Alain Houde², Enrico Buenaventura³, Peter Müller¹, Julie Brassard²,
Katie Christensen³, et Jennifer Liu³.

¹ Laboratoire de Saint-Hyacinthe
Agence canadienne d'inspection des aliments
3400, boul. Casavant O.
Saint-Hyacinthe (Qc)
Canada J2S 8E3
Courriel: trottieryl@inspection.gc.ca

² Centre de recherche et de développement
Agriculture et agroalimentaire Canada
3600, boul. Casavant O.
Saint-Hyacinthe (Qc)
Canada J2S 8E3
Courriel: houdea@agr.gc.ca

³ Laboratoire de Burnaby
Agence canadienne d'inspection des aliments
2250 Boundary Road O.
Burnaby (C.-B.)
Canada VM 4L9
Buenaventura@inspection.gc.ca

1. **APPLICATION**

La présente méthode s'applique à la concentration et à la détection des Norovirus appartenant aux génogroupes I et II provenant d'huîtres contaminées. Cette méthode donne des résultats acceptables chez les mollusques bivalves comme les huîtres et les moules. La méthode ne permet pas de distinguer entre des virus infectieux et non infectieux.

2. **DESCRIPTION**

Initialement, des résultats satisfaisants furent obtenus au moyen de cette méthode avec des huîtres et des moules contaminées artificiellement et naturellement par des Norovirus de génogroupes I et II. Elle a été utilisée par la USFDA dans le cadre d'une grande étude inter-laboratoires. La méthode initiale a été modifiée et améliorée pour permettre le dépistage systématique des Norovirus de génogroupes I et II.

3. **PRINCIPE**

À l'aide d'un procédé légèrement modifié, décrit par Kingsley et Richards (8.1), les particules virales sont concentrées suite à une homogénéisation par sonication des glandes digestives dans un tampon glycine, suivie d'une précipitation au polyéthylène glycol (PEG). L'ARN total est ensuite extrait à l'aide du réactif TriReagent[®]. La majorité de l'ARN total extrait provient de l'huître. L'enrichissement de l'ARN viral de l'ARN total est possible grâce à l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'oligo-dT. Ces billes magnétiques fixent l'ARN messager (ARNm) polyadénylé (queue poly-A) des Norovirus. L'extrait final est alors soumis à une réaction de transcriptase inverse

et d'amplification en chaîne de l'ap polymérase (TI-ACP) afin d'amplifier un fragment spécifique selon les amorces utilisées (i.e. un fragment de Norovirus de génogroupes I ou II, et le gène cible de l'actine chez l'huître).

4. DÉFINITION DES TERMES

Voir l'Annexe A du Volume 3.

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Le nombre d'échantillons à prélever doit être déterminé en fonction des besoins du client (ex. collecte de données ou programme de surveillance) ou de l'objet de l'enquête (ex. épidémie).

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Note : Le superviseur du laboratoire doit veiller à ce que l'analyse décrite dans la présente soit réalisée conformément à la norme internationale ISO/IEC 17025:1999 (ou la version la plus récente) : « Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais ».

- 1) Thermocycleur (Eppendorf®Mastercycler® Gradient ou l'équivalent).
- 2) Four à micro-ondes ou plaque chauffante.
- 3) Nécessaire d'électrophorèse pour gels submergés, avec peignes appropriés et bloc d'alimentation.
- 4) Transilluminateur UV à ondes courtes pour visualiser l'ADN dans les gels d'agarose.
- 5) Système de photo-documentation (facultatif, pour les documents photographiques), comprenant un appareil polaroid (fixé ou non), une boîte de visualisation, des films Polaroid 667™ ou l'équivalent.
- 6) Micropipettes réglables : 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL et 100 –1000 µL, avec embouts appropriés munis de filtres.
- 7) Blocs chauffants (produits de VWR scientific ou l'équivalent) convenant aux microtubes à centrifuger de 1,5 mL et pouvant maintenir des températures de 37 °C, 65 °C, 70 °C, 90 °C et 95 °C.
- 8) Bain-marie pouvant maintenir une température de 37 °C.

Note : Il incombe au responsable de chaque laboratoire de veiller à ce que les blocs chauffants et les bains-marie soient maintenus aux températures recommandées. Lorsque la température recommandée est de 37 °C, le bain-marie doit être à 37 °C +/- 1 °C. Pour toutes les autres températures, l'écart peut être de +/- 2° C.

- 9) Mélangeur Vortex.
- 10) Microtubes à centrifuger : 2,0 et 1,5 mL.
- 11) Centrifugeuse réfrigérée SORVALL® RC-5B Plus™ équipée d'un rotor SS-34 (8 X 50 mL, tubes en polypropylène copolymère Oak Ridge) ou l'équivalent.
- 12) Tubes à centrifugation Oak Ridge de 50 mL (en polypropylène copolymère ou en polypropylène).
- 13) Centrifugeuse réfrigérée IEC DPR-6000 ou l'équivalent.
- 14) Rotor IEC DPR-6000 pour tubes de 50 et 15 mL ou l'équivalent.
- 15) Tubes à centrifugation de 15 mL en polypropylène. (Sarstead® n° 62.554.002 ou de meilleure qualité).

- 16) Dispositif d'attraction de billes magnétiques Dynal[®], modèle MPC-S (n° 120.20, aucune substitution).
- 17) Mélangeur Dynal[®] Biotech (n° 947.01 ou l'équivalent).
- 18) Sonicateur et sonde (modèle Sonics & Materials, 375 watts ou l'équivalent).
- 19) Microcentrifugeuse.
- 20) Tubes pour ACP à paroi mince, 0,2 mL ou 0,5 mL (selon le modèle du thermocycleur).
- 21) Minuterie.
- 22) Contenant à glace.
- 23) Agitateurs magnétiques.
- 24) Congélateurs pouvant maintenir des températures de - 20 °C et de - 70 °C.
- 25) Trousse de RT-PCR OneStep de Qiagen (n° 210210 ou 210212, aucune substitution). (8.6)
- 26) De plus, les produits chimiques et réactifs suivants doivent être disponibles :

Voir la section 10 pour la liste des tampons et des réactifs.
Agarose (qualité biologie moléculaire).
Orange G (colorant de repérage utilisé dans le tampon de chargement [10.7]).
Échelle d'ADN de 50 pb (ou l'équivalent).
Bromure d'éthidium (EtBr) (qualité biologie moléculaire).
Inhibiteur de la RNase.
Acide borique (qualité biologie moléculaire).
Eau exempte de DNase et de RNase (qualité biologie moléculaire).
Polyéthylène glycol (PEG) 8000 (qualité biologie moléculaire).
Chlorure de sodium (NaCl) (qualité biologie moléculaire).
- 27) Billes oligo(dT)₂₅ (Dynal n° 610.05, aucune substitution).
- 28) Tampon de liaison (voir la section 10.3 pour la préparation).
- 29) Tampon de lavage (voir la section 10.4 pour la préparation).
- 30) Tampon glycine (voir la section 10.1 pour la préparation).
- 31) Réactif TriReagent, Sigma (n° T9424, aucune substitution). (8.7)
- 32) Chloroforme (qualité CLHP ou de meilleure qualité).
- 33) Isopropanol (qualité CLHP ou de meilleure qualité).
- 34) Éthanol froid à 75 % dans de l'eau exempte de DNase et de RNase (conservé à -20 °C).
- 35) Amorces Kageyama (COG1F et COG1R) pour la détection des Norovirus de génogroupe I (voir la section 9.1 pour la séquence d'ADN).
- 36) Amorces Kageyama (COG2F et COG2R) pour la détection des Norovirus de génogroupe II (voir la section 9.1 pour la séquence d'ADN).
- 37) Amorces Monroe (431,432,433 et 434) pour la détection des Norovirus de génogroupes I et II (voir la section 9.1 pour la séquence d'ADN).

- 38) Amorces Actin-A et Actin-R pour la détection de l'ARNm de l'actine d'huître (voir la section 9.1 pour la séquence d'ADN).
- 39) Solution de reconditionnement des billes magnétiques (Dyna) :
Hydroxyde de sodium (NaOH) (qualité ACS ou de meilleure qualité)
- 40) Tampon de conservation des billes :
Tris[hydroxyméthyl]aminométhane (ex. Tris base, qualité biologie moléculaire).
Éthylènediaminetétraacétate de disodium (EDTA) (qualité biologie moléculaire).
Tween20 (qualité biologie moléculaire).
Azide de sodium (qualité ACS ou de meilleure qualité).

7. MÉTHODE

7.1 Manipulation des échantillons

- 7.1.1 Les échantillons doivent être réfrigérés (0 – 5 °C) pendant le transport et conservés à cette température.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation en vue de l'analyse

- 7.2.1 Préparer tous les tampons et solutions selon les indications de la section 10.
- 7.2.2 Préparer et vérifier tous les témoins. Pour l'analyse par TI-ACP, inclure un témoin négatif et un témoin positif spécifique des amorces utilisées (c.-à-d. Norovirus de génogroupes I et II).

7.3 Extraction et concentration de virus des échantillons d'huîtres

AVIS DE SÉCURITÉ : IL FAUT PRENDRE DES MESURES DE PRÉCAUTION ADDITIONNELLES LORSQUE L'ON TRAVAILLE AVEC DES HUÎTRES/MOULES POUVANT ÊTRE CONTAMINÉES PAR DES NOROVIRUS. PORTER UN MASQUE, DES PROTÈGE-MANCHES ET DES GANTS DOUBLES EN NITRILE POUR LES ÉTAPES D'EXTRACTION ET DE CONCENTRATION, LESQUELLES DOIVENT ÊTRE EFFECTUÉES SOUS UNE HOTTE DE CONFINEMENT BIOLOGIQUE.

- 7.3.1 Enlever une coquille de chaque huître, égoutter la liqueur (liquide du manteau) dans un contenant de matières à éliminer, et déposer la glande digestive (sans le muscle adducteur qui demeure fixé à la coquille) dans un tube à centrifugation stérile de 50 mL taré. Idéalement, on doit prélever $1,5 \pm 0,1$ g de glande digestive.

Note : Résultant du mécanisme de bioaccumulation, l'estomac et les diverticules digestifs sont les éléments dans lesquels on trouve les plus hauts comptes de virus chez les mollusques à coquille. Afin de procéder à l'identification adéquate des diverses composantes anatomiques le lecteur est invité à consulter les figures 1,2,3 et 4 à l'**Annexe 1**)

Note : L'espace de centrifugation est un facteur limitant du nombre d'échantillons pouvant être traités simultanément.

- 7.3.2 Ajouter 12 mL de tampon glycine stérile glacé dans le tube à centrifugation de 50 mL et placer le tube dans un petit béccher rempli de glace. Insérer la sonde dans le tube.

AVIS DE SÉCURITÉ : LES ULTRASONS PEUVENT ENDOMMAGER L'OUÏE : PORTER DES PROTECTEURS ANTIBRUIT (ex. BOUCHONS D'OREILLE ET/OU CASQUE ANTIBRUIT).

- 7.3.3 Homogénéiser l'échantillon pendant 1 minute tout en faisant doucement tourner la sonde dans le tube à centrifugation de 50 mL. Régler le sonicateur à 40 % et la puissance de sortie à 3,5 (choisir un réglage équivalent pour d'autres sonicateurs).

Note : L'intégrité du virus est mieux conservée à des températures froides; dans la mesure du possible, maintenir les échantillons sur glace en tout temps.

Note : Toujours nettoyer la sonde avec de l'alcool à 70 % et l'essuyer entre les échantillons.

- 7.3.4 Mélanger le contenu du tube à centrifugation de 50 mL par inversion et l'incuber dans un bain-marie réglé à 37 °C pendant 30 minutes.
- 7.3.5 Centrifuger l'homogénat à 3700 x g pendant 120 minutes à 4 °C. Décanter le surnageant dans un tube à centrifugation stérile de 50 mL et ajouter un volume égal de PEG à 16 %. Inverser le tube 7 fois et incuber toute la nuit dans un seau de glace (18 heures ± 1 heure).
- 7.3.6 Centrifuger le tube à 3700 x g pendant 14 minutes à 4 °C, puis jeter le surnageant.

Note : Tous les réactifs utilisés pour l'extraction doivent être à la température ambiante (23 °C ± 3 °C) avant leur utilisation (c.-à-d. TriReagent).

- 7.3.7 Remettre le culot en suspension dans 5 mL de TriReagent, puis transférer dans un tube à centrifugation de 15 mL.

AVIS DE SÉCURITÉ : LE TriReagent CONTIENT DU PHÉNOL : MANIPULER AVEC SOIN ET ÉLIMINER COMME UN DÉCHET DANGEREUX.

- 7.3.8 Vortexer le tube de 15 mL pendant 30 secondes, puis incuber à la température ambiante (23 °C ± 3 °C) pendant 5 minutes.
- 7.3.9 Ajouter 1,2 mL de chloroforme au tube de 15 mL et vortexer pendant 30 secondes. Incuber à la température ambiante (23 °C ± 3 °C) pendant 5 minutes.
- 7.3.10 Centrifuger le tube de 15 mL à 5000 x g pendant 24 minutes à 4 °C. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un tube à centrifugation propre de 15 mL. Ajouter 0,5 volume d'isopropanol et inverser 5 fois pour mélanger. Incuber à la température ambiante pendant 5 minutes.

Note : Se référer à la figure 5 de l'Annexe 1 afin de visualiser un exemple de séparation des différentes couches obtenues après centrifugation.

- 7.3.11 Centrifuger le tube de 15 mL à 5 000 x g pendant 5 minutes à 4 °C, prélever et jeter le surnageant.
- 7.3.12 Laver la surface du culot d'ARN avec 5 mL d'éthanol froid à 75 % dans de l'eau exempte de DNase et de RNase (conservé à -20 °C); ne pas défaire le culot. Laisser sécher de 5 à 10 minutes avant d'ajouter de l'eau exempte de DNase et de RNase au culot d'ARN.

- 7.3.13 Ajouter 500 µl d'eau exempte de DNase et de RNase au culot d'ARN pour le dissoudre complètement. Transférer l'ARN dans un microtube de 1,5 mL.

Note : Au besoin, pour dissoudre le culot, on peut chauffer l'échantillon à 60 °C, dans un bloc chauffant, puis vortexer.

Note : Le concentré d'ARN total (huître/virus) peut être conservé à -70 °C ou purifié immédiatement et utilisé pour la TI-ACP

- 7.3.14 Transférer 400 µl de l'ARN total dans un microtube de 1,5 mL et ajouter 400 µl de tampon de liaison, puis vortexer pendant 30 secondes.

- 7.3.15 Incuber à 65 °C pendant 2 minutes dans un bloc chauffant, puis refroidir sur glace.

- 7.3.16 Bien mélanger la solution de billes oligo(dT)₂₅ (Dyna) en inversant le contenant (à la main) pendant 30 secondes.

- 7.3.17 Transférer 100 µl de billes oligo(dT)₂₅ dans un microtube de 2,0 mL et placer celui-ci dans le dispositif d'attraction de billes magnétiques muni de la lame magnétique et l'y laisser 60 secondes, puis prélever la solution en la pipettant doucement pour ne pas déranger les billes accumulées sur la paroi du tube. Jeter la solution. Retirer la lame magnétique de l'appareil d'attraction.

Note : Pour éviter d'endommager le dispositif d'attraction, insérer la lame magnétique comme suit : extrémité saillante vers le bas et côté avec la bande magnétique face aux tubes.

- 7.3.18 Ajouter 100 µl de tampon de liaison au microtube de 2,0 mL et mélanger doucement. Insérer la lame magnétique dans le dispositif d'attraction et attendre 60 secondes. À l'aide d'une pipette, éliminer le tampon de liaison. Retirer la lame magnétique.

- 7.3.19 Ajouter 400 µl de tampon de liaison ainsi que les 800 µl d'ARN total (de l'étape 7.3.14) au microtube de 2,0 mL contenant les 100 µl de billes-oligo(dT)₂₅.

- 7.3.20 Inverser le microtube de 2,0 mL deux fois (à la main) et le placer sur un mélangeur d'échantillon réglé à 8 tr/min. Laisser agiter pendant 5 minutes.

Note : Pour éliminer toute solution qui resterait sous le capuchon entre les étapes de lavage, centrifuger pendant 2 secondes avant d'utiliser le dispositif d'attraction magnétique.

- 7.3.21 Insérer la lame magnétique dans le dispositif d'attraction magnétique et attendre 60 secondes, puis éliminer le tampon de liaison du tube. Retirer la lame magnétique.

Note : Si la séparation des billes magnétiques est incomplète, prolonger le temps d'incubation jusqu'à ce qu'elles se séparent adéquatement.

- 7.3.22 Laver les billes magnétiques avec 500 µl de tampon de lavage. Mélanger en inversant le tube 5 fois. Insérer la lame magnétique dans le dispositif d'attraction et attendre 60 secondes, puis éliminer le tampon de lavage. Retirer la lame magnétique.

Note : Pour éliminer toute solution qui resterait sous le capuchon entre les étapes de lavage, centrifuger pendant 2 secondes avant d'utiliser le dispositif d'attraction magnétique.

- 7.3.23 Répéter l'étape de lavage (7.3.22) encore 2 fois.
- 7.3.24 Éliminer les dernières traces du tampon de lavage en centrifugeant 2 secondes et en utilisant la lame magnétique et le dispositif d'attraction de billes.
- 7.3.25 Remettre les billes magnétiques en suspension dans 25 µl d'eau exempte de Rnase/DNase, puis éluer l'ARN viral polyA des billes en plaçant le tube dans un bloc chauffant à 90 °C pendant 2 minutes.
- 7.3.26 Séparer la solution chauffée des billes en utilisant le dispositif d'attraction de billes.
- 7.3.27 Transférer la solution (ARN polyA) dans un tube de 0,5 mL ou 1,5 mL.
- 7.3.28 Ajouter 20 unités d'inhibiteur de la Rnase à la solution.
- 7.3.29 Conserver le tube de 0,5 mL ou 1,5 mL à -70 °C.

7.4 Épreuve de dépistage des Norovirus par TI-ACP (c.-à-d. détection de l'ARNm d'actine d'huître et des Norovirus génogroupes I et II)

- 7.4.1 À l'aide de la trousse de RT-PCR OneStep de Qiagen, éprouver l'ARN polyA de chaque échantillon avec les 3 séries d'amorces ciblant les Norovirus et la série d'amorces ciblant le gène domestique de l'actine d'huître (9.1).
- 7.4.2 Ajouter 5,0 µl d'ARN polyA (7.3.29) à 20,0 µl de mélange à réaction ACP (10.5).
- 7.4.3. Insérer les microtubes dans un thermocycleur et procéder à l'amplification par TI-ACP conformément au programme décrit en 9.2.
- 7.4.4 Lorsque la TI-ACP est terminée, analyser les produits d'ACP par électrophorèse sur gel d'agarose (7.5). Au besoin, les amplicons peuvent être conservés à 4 °C pendant une semaine avant l'analyse.

7.5 Électrophorèse sur gel d'agarose

- 7.5.1. Préparer un gel d'agarose à 3,0 % (p/v) dans du tampon TBE 0,5X (Tris-Borate-EDTA). Dissoudre l'agarose par chauffage avec agitation sur une plaque chauffante ou dans un four à microondes réglé à la puissance maximale pendant 1 à 2 minutes. S'assurer que l'agarose est complètement dissous (c.-à-d. liquide clair sans particules en suspension).
- 7.5.2. Refroidir l'agarose à une température d'environ 45 °C et y ajouter la quantité requise de bromure d'éthidium (EtBr) pour obtenir une concentration finale de 0,5 µg/mL dans le gel d'agarose (8.8). Mélanger doucement en évitant la formation de bulles.

Note : L'ajout d'EtBr au gel est facultatif si l'on immerge ce dernier dans une solution d'EtBr après la migration.

AVIS DE SÉCURITÉ : L'EtBr EST UN MUTAGÈNE PUISSANT : PORTER DES GANTS EN NITRILE POUR MANIPULER CE PRODUIT.

- 7.5.3. Verser dans un plateau pour gel. Éviter la formation de bulles et tout piégeage de bulles. Ajouter un peigne pour former les puits et laisser solidifier pendant 20 à 30 minutes.
- 7.5.4. Préparer les échantillons d'électrophorèse : dans des microtubes propres, mélanger 2,5 µl de tampon de repérage (tampon de chargement concentré 10X) et 25 µl de produit d'ACP.

- 7.5.5. Lorsque l'agarose est solidifié, enlever le peigne et placer le plateau contenant le gel dans l'appareil à électrophorèse. Dans le réservoir, verser suffisamment de tampon TBE 0,5X pour recouvrir le gel. Pipetter environ 18 µl d'échantillon (7.5.4) et le déposer doucement dans les puits du gel submergé. Pipetter un échantillon de marqueur de poids moléculaire d'ADN (ex. échelle d'ADN de 50 pb) dans un puits vide. Inclure également un témoin positif, un témoin négatif ainsi qu'un témoin de réactifs.
- 7.5.6. Brancher l'appareil au bloc d'alimentation, la cathode (-, fil noir) étant située à l'extrémité supérieure (près des puits) et l'anode (+, fil rouge) à l'extrémité inférieure (à la fin) du gel. Appliquer environ 135 volts et laisser migrer environ 30 minutes ou jusqu'à ce que le colorant de repérage Orange G ait parcouru approximativement les 3/4 de la longueur du gel.

Note : Le voltage et le temps de migration peuvent être modifiés en fonction du bloc d'alimentation utilisé.

- 7.5.7 Enlever le gel de son plateau et visualiser les bandes d'ADN en les illuminant à la lumière UV (ondes courtes) au moyen d'un transilluminateur. Les gels peuvent être photographiés sur film Polaroid 667™ pour en faciliter l'analyse et aux fins de conservation des données. On peut également avoir recours à un système de traitement numérique.

Note : Si l'EtBr n'a pas été ajouté directement au gel, enlever le gel du plateau et le plonger dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) pendant 30 à 45 minutes pour en colorer l'ADN (8.8). Utiliser une pelle à gel pour sortir le gel du bain de coloration, le rincer brièvement à l'eau du robinet et visualiser les bandes d'ADN en exposant le gel à la lumière UV.

AVIS DE SÉCURITÉ : LA LUMIÈRE UV PEUT ENDOMMAGER LES YEUX : PORTER DES LUNETTES DE SÉCURITÉ.

7.6 Interprétation des résultats d'ACP

- 7.6.1 Les amplicons (produits d'ACP) générés par les amorces Actin-A/R, COG1F/R, COG2F/R et « 431,432,433,434 » sont des fragments d'ADN bicaténaire de 257 pb, 85 pb, 98 pb et 213 pb respectivement. Par conséquent, un test d'ACP positif produira un fragment d'ADN spécifique de la séquence ciblée et apparaîtra comme une bande intense sur le gel coloré au bromure d'éthidium. La taille moléculaire de la bande peut être déterminée en comparant la migration de la bande à celle des bandes du témoin marqueur de poids moléculaire (ex. échelle d'ADN de 50 pb) sur le même gel. (Voir figure 6 à l'Annexe 1)
- 7.6.2 Habituellement un résultat négatif ne donne lieu à aucune bande visible dans un gel coloré au bromure d'éthidium. Bien qu'il s'agisse de cas extrêmement rares, des échantillons donnant des bandes ne correspondant pas à la taille prévue de l'amplicon (amplification non spécifique) sont considérés négatifs.
- 7.6.3 Une bande spécifique précise devrait être visible dans le couloir du témoin positif du Norovirus ciblé. L'absence de bande spécifique dans ce couloir invalide le test d'ACP et les échantillons doivent être analysés de nouveau. Dans les cas où l'on observe une réaction positive à l'égard du Norovirus mais aucune réaction à l'égard du gène de l'actine, il peut s'agir d'une contamination croisée entre deux échantillons.
- 7.6.4 La présence d'une bande correspondant au témoin positif dans le couloir du témoin négatif ou du témoin réactif contenant les amorces de Norovirus indique un problème de contamination du mélange réactionnel, et tout le lot est considéré suspect et doit être jeté. Les échantillons doivent être analysés de nouveau à l'aide de réactifs fraîchement préparés.

- 7.6.5 Tout échantillon donnant lieu à une bande distincte avec les amorces de Norovirus, correspondant à la bande du témoin positif, est considéré comme un positif présumé. Le produit d'ACP doit être soit purifié, soit purifié et cloné, puis séquencé pour confirmer la souche potentielle de Norovirus trouvée dans l'huître.

7.7 **Régénération des billes-oligo(dT)₂₅ (8.4):**

- 7.7.1 Les billes-oligo(dT)₂₅ (Dyna) peuvent être réutilisées jusqu'à 4 fois sans perte de rendement. Remettre les billes en suspension (volume original de 200 µl) dans 200 µl de solution de reconditionnement et transférer la suspension dans un nouveau tube exempt de RNase.
- 7.7.2 Incuber à 65 °C dans un bloc chauffant pendant 2 minutes.
- 7.7.3 Placer le tube dans le dispositif d'attraction magnétique Dynal MPC-S pendant au moins 30 secondes, puis enlever le surnageant.
- 7.7.4 Laver deux fois avec la solution de reconditionnement, en répétant les étapes 7.7.1 et 7.7.3 deux fois.
- 7.7.5 Remettre les billes-oligo(dT)₂₅ en suspension dans 200 µl de tampon de conservation Oligo(dT)₂₅.
- 7.7.6 Placer le tube sur l'aimant pendant au moins 30 secondes, puis enlever le surnageant.
- 7.7.7 Répéter les étapes 7.7.5 et 7.7.6 trois fois.
- 7.7.8 Remettre les billes-oligo(dT)₂₅ en suspension dans du tampon de conservation Oligo(dT)₂₅ de manière à ce que la concentration des billes régénérées corresponde, à l'œil, à celle de billes qui n'ont pas été régénérées. Les billes sont maintenant régénérées et prêtes à être utilisées pour un autre isolement d'ARNm. Conserver à 2-8 °C.

Note: Ne pas mélanger des billes-oligo(dT) ₂₅ régénérées avec des billes de la suspension originale.
--

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 **Kingsley, D.H. and Richards, G.P.** 2001. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Noroviruses in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4152-4157
- 8.2 **Shieh, Y.C. Baric, R.S., Woods, J.W., and Calci, K.R.** 2003, Molecular surveillance of enterovirus and norwalk-like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:7130-7136
- 8.3 **Kageyama T, Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N. and Katayama, K.** 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Noroviruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:1548-1557, Vol. 41, No. 4
- 8.4 **Dynal Biotech insert of Dynabeads-oligo(dT)₂₅**, printed 0501, Rev. No.: 004 disponible à l'adresse www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/Dynabeads%20Oligo.pdf
- 8.5 **Anderson, A.D., Heryford, A.G., Sarisky, J.P., Higgins, C., Monroe, S.S., Beard, R.S., Newport, C.M., Cashdollar, J.L., Fout, G.S., Robbins, D.E., Seys, S.A., Musgrave, K.J., Medus, C., Vinjé, J., Bresee, J.S., Mainzer, H.M. and Glass, R.I.** 2003. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *Journal of Infectious Diseases*. 187: 303-6.
- 8.6 **Qiagen®** OneStep RT-PCRKit Handbook. May 2002. For fast and efficient one-step RT-PCR. 2800

Argentia Road Unit 7 Mississauga Ontario L5N 8L2. p. 10-12. Disponible à l'adresse www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/PCRAndReverseTranscription/KitsAndEnzymes/RTPCR_OneStep/1020892HBRTPCR_05202.pdf

- 8.7 Sigma®.** 1999. Technical Bulletin MB-205. Product Information TRI-Reagent Product T 9424. (6 pages) disponible à l'adresse www.sigmaaldrich.com/sigma/bulletin/t9424bul.pdf
- 8.8 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, É.-U., p. 6.15
- 8.9 Howard, D.W. and Smith, C.S.** 1983, Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC 25:97.

9. AMORCES ET PROGRAMME DE CYCLES DE TEMPÉRATURE POUR L'ACP

9.1 Amorces ACP

Dépistage par ACP : Amorce d'oligonucléotides conçues en fonction de la région la plus conservée du génome de Norovirus.

Amorces de Kageyama (8.3) pour la détection des Norovirus du génogroupe I (fragment de 85 pb) :

COG1F - sens - 20 bases = 5'-CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA- 3'
COG1R - antisens - 22 bases = 5'-CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C-3'

Amorces de Kageyama (8.3) pour la détection des Norovirus du génogroupe II (fragment de 98 pb) :

COG2F - sens - 26 bases = 5'-CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3'
COG2R - antisens - 21 bases = 5'-TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA-3'

Amorces de Monroe (8.5) pour la détection des Norovirus des génogroupes I et II (fragment de 213 pb) :

431 - sens - 20 bases = 5'-TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA-3'
432 - sens - 20 bases = 5'-TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA-3'
433 - antisens - 21 bases = 5'-GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT-3'
434 - antisens - 21 bases = 5'-GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT-3'

Cible du gène domestique de l'actine chez l'huître (8.2)

Amorces pour la détection de l'ARNm de l'actine de l'huître (fragment de 257 pb) :

Actin-A - sens - 23 bases = 5'-TGG AAT CTG CYG GWA TCC ATG AA-3'
Actin-R - antisens - 23 bases = 5'-CCG ATC CAG ACG GAG TAT TTC CT-3'

Composition des mélanges de bases standard			
Lettre	Nucléotides	Lettre	Nucléotides
R	A, G	H	A, C, T
Y	C, T	B	C, G, T
M	A, C	V	A, C, G
K	G, T	D	A, G, T
S	C, G	N	A, C, G, T
W	A, T	X	A, C, G, T

Note : La synthèse d'oligonucléotides peut habituellement être donnée en sous-traitance à une université locale, et il existe de nombreuses firmes de biotechnologie qui offrent ce service. Si vous avez besoin d'aide à ce sujet, veuillez communiquer avec les auteurs du présent document.

9.2 Programme de cycles de température pour toutes les amorces de Norovirus spécifiques des génogroupes I et II, ainsi que pour la cible du gène domestique de l'actine chez l'huître.

Le programme du thermocycleur doit être réglé selon la séquence de paramètres ci-dessous :

Étape No	Processus	Durée	Température	Remarques
1	Transcription inverse	30 minutes	50 °C	
2	Étape initiale d'activation de l'ACP	15 minutes	95 °C	(ADN polymérase Taq HotStart) Les transcriptases inverses Omniscript et Sensiscript sont inactivées et la matrice d'ADNc est dénaturée
3	40 cycles (a + b + c) a. Dénaturation thermique b. Renaturation c. Extension	30 secondes 30 secondes 45 secondes	94 °C 52 °C 72 °C	
4	Élongation finale	5 minutes	72°C	

Note : L'utilisation d'autres thermocycleurs que les modèles indiqués précédemment peut compromettre le rendement de l'ACP, et il peut être nécessaire d'optimiser les paramètres en fonction du modèle utilisé.

Note : Pour de meilleurs résultats, on recommande d'utiliser des amorces purifiées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

10. RÉACTIFS

10.1 Tampon glycine pH 9,5

7,50 g glycine (qualité biologie moléculaire)
17,55 g NaCl (qualité biologie moléculaire)

Ajouter suffisamment d'eau distillée pour obtenir un volume de 800 mL, dissoudre et ajuster le pH à 9. Compléter le volume à 1,0 litre et autoclaver (121 °C 15 minutes) ou ajuster le pH à 9,5 et stériliser par filtration.

Note : Le pH final doit être de 9,5 ± 0,1 après l'autoclavage.

Note : Le tampon glycine à pH 9,5 est stable pendant 9 mois à 4 °C

10.2 Polyéthylèneglycol (PEG) à 16 %

80 g PEG 8000 (qualité biologie moléculaire).
15,34 g NaCl (qualité biologie moléculaire).

Ajouter suffisamment d'eau distillée pour obtenir un volume de 500 mL.
Dissoudre et autoclaver (121 °C 15 minutes).

Note : Le PEG à 16 % est stable pendant 9 mois à 4 °C.

10.3 Tampon de liaison

Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (qualité biologie moléculaire disponible sur le marché).
Chlorure de lithium (LiCl) 1,0 M (qualité biologie moléculaire disponible sur le marché).
EDTA 2 mM (qualité biologie moléculaire disponible sur le marché).

Exemple de préparation de 50 mL de tampon de liaison à partir de solutions commerciales de Tris-HCl 0,1 M, de LiCl 8 M, d'EDTA 0,5 M et d'eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase) :

$$50 \text{ mL} * \text{Tris-HCl } 0,020 \text{ M, pH } 7,5 = x \text{ mL} * \text{Tris-HCl } 0,1 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 10 \text{ mL de Tris-HCl } 0,1 \text{ M}$$

$$50 \text{ mL} * \text{LiCl } 1,0 \text{ M} = x \text{ mL} * \text{LiCl } 8 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 6,25 \text{ mL de LiCl } 8,0 \text{ M}$$

$$50 \text{ mL d'EDTA } 0,002 \text{ M} = x \text{ mL} * \text{d'EDTA } 0,5 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 0,200 \text{ mL d'EDTA } 0,5 \text{ M}$$

Compléter le volume à 50 mL avec de l'eau distillée stérile (exempte de RNase et de Dnase).

$$x \text{ mL} = 33,55 \text{ mL d'eau}$$

Mélanger tous les réactifs dans un tube à centrifugation stérile de 50 mL, puis répartir la solution en aliquotes de plus petit volume pour la conservation.

Note : Le tampon de liaison est stable pendant 12 mois à la température ambiante (23 °C ± 3 °C).

10.4 Tampon de lavage

Tris-HCl 10 mM , pH 7,5 (qualité biologie moléculaire commerciale).
Chlorure de lithium (LiCl) 0,15 M (qualité biologie moléculaire commerciale).
EDTA 1 mM (qualité biologie moléculaire commerciale).

Exemple de préparation de 50 mL de tampon de lavage à partir de solutions commerciales de Tris-HCl 0,1 M, LiCl 8 M, EDTA 0,5 M et d'eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase) :

$$50 \text{ mL} * \text{Tris-HCl } 0,010 \text{ M} = x \text{ mL} * \text{Tris-HCl } 0,1 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 5 \text{ mL de Tris-HCl } 0,1 \text{ M}$$

$$50 \text{ mL} * \text{LiCl } 0,15 \text{ M} = x \text{ mL} * \text{LiCl } 8 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 0,938 \text{ mL de LiCl } 1,0 \text{ M}$$

$$50 \text{ mL} * \text{EDTA } 0,001 \text{ M} = x \text{ mL} * \text{EDTA } 0,5 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 0,100 \text{ mL d'EDTA } 0,5 \text{ M}$$

Compléter le volume à 50 mL avec de l'eau distillée (exempte de DNase et de Rnase).

$$x \text{ mL} = 43,962 \text{ mL d'eau}$$

Mélanger tous les réactifs dans un tube à centrifugation stérile de 50 mL, puis répartir la solution en aliquotes de plus petit volume pour la conservation.

Note : Le tampon de lavage est stable pendant 12 mois à la température ambiante (23 °C ± 3 °C).

10.5 Trousse de RT-PCR OneStep de Qiagen

Toutes les solutions-mères sont conservées à -20 °C jusqu'à l'utilisation. Voici comment préparer une quantité suffisante de solutions pour 20 réactions.

Nota : Tous les réactifs, l'eau exempte de DNase et de RNase, les embouts de pipette et autres matériels entrant en contact avec les échantillons ou les réactifs pour la TI-ACP doivent être stériles ou autoclavés avant l'utilisation pour éliminer tout contaminant et/ou DNase. Pour éviter des problèmes de contamination, tous les réactifs doivent être préparés dans une enceinte à flux laminaire qui n'a jamais été exposée à des Norovirus ni à des produits d'ACP de Norovirus. Pour éviter toute amplification non spécifique, placer tous les réactifs entrant dans la composition du mélange sur glace ou sur un support réfrigéré.

Composantes de la TI-ACP	Concentration initiale	Solutions-mères requises pour 20 réactions Amorces Monroe	Volume par tube	Concentration finale
Eau exempte de RNase	-----	140,0 µl	7 µl	-----
Tampon RT-PCR OneStep QIAGEN 5X	5X	100,0 µl	5 µl	1X
Mélange dNTP	10 mM/de chaque dNTP	20,0 µl	1 µl	400 µM
Amorce 431 - sens	10 µM/par amorce	30,0 µl	1,5 µl	0,6 µM
Amorce 432 - sens	10 µM/par amorce	30,0 µl	1,5 µl	0,6 µM
Amorce 433 - antisens	10 µM/par amorce	30,0 µl	1,5 µl	0,6 µM
Amorce 434 - antisens	10 µM/par amorce	30,0 µl	1,5 µl	0,6 µM
Mélange pour enzyme RT-PCR OneStep QIAGEN	-----	20,0 µl	1 µl	-----
Volume total		400 µl	20 µl	-----
Distribuer par tube		20 µl	-----	-----
Matrice		5 µl	-----	-----

Composantes de la TI_ACP	Concentration initiale	Solutions-mères requises pour 20 tubes de réactions Amorces Kageyama pour les génogroupes I ou II et amorces actine	Volume par tube	Concentration finale
Eau exempte de RNase	-----	180,0 µl	9 µl	-----
Tampon RT-PCR OneStep QIAGEN 5X	5X	100,0 µl	5 µl	1Xx
Mélange dNTP	10 mM/de chaque dNTP	20,0 µl	1 µl	400 µM
Amorce COG1F - sens ou COG2F - sens	10 µM/par amorce	30,0 µl	1,5 µl	0,6 µM
Amorce COG1R - antisens ou COG2R - antisens	10 µM/par amorce	30,0 µl	1,5 µl	0,6 µM
Amorce Actin-A - sens	10 µM/par amorce	10,0 µl	0,5 µl	0,2 µM
Amorce Actin-R - antisens	10 µM/par amorce	10,0 µl	0,5 µl	0,2 µM
Mélange pour enzyme RT-PCR OneStep QIAGEN	-----	20,0 µl	1 µl	-----
Volume total		400 µl	20 µl	-----
Distribuer par tube		20 µl	-----	-----
Matrice		5 µl	-----	-----

10.6 **Tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) 5X** ou tampon commercial

Tris Base (qualité biologie moléculaire)	54,0 g
Acide borique (qualité biologie moléculaire)	27,5 g
EDTA de disodium (qualité biologie moléculaire)	3,75 g

Ajouter suffisamment d'eau distillée pour obtenir un volume de 800 mL, dissoudre et compléter le volume à 1,0 litre. Ce tampon est utilisé à la dilution 1:10 (tampon TBE 0,5X) dans de l'eau distillée.

Le pH du tampon 0,5X devrait être de 8,3. Ne pas ajuster le pH.

10.7 **Colorant de repérage/tampon de chargement** (ou solutions commerciales.)

Sel de sodium Orange G 10X	0,025 g	0,25 % (p/v)
Glycérol	4 mL	40 % (p/v)
Eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase)	6 mL	

Bien mélanger tous les ingrédients et stériliser par autoclavage (121 °C pendant 15 minutes) ou par filtration. Conserver en aliquotes de 1,0 mL à -20 °C.

Note : Le colorant de repérage/tampon de chargement est stable pendant 12 mois à -20 °C.

10.8 Standard de poids moléculaire d'ADN (préparation commerciale).

Bien qu'il existe de nombreux types de préparations commerciales de marqueurs de taille moléculaire d'ADN, l'échelle d'ADN de 50 pb offre une gamme utile de tailles de fragments et facilite l'estimation de la taille des amplicons produits par cette réaction d'ACP.

10.9 Solution de reconditionnement des billes-oligo(dT)₂₅

NaOH 0,1 M (qualité ACS ou de meilleure qualité).

Exemple de préparation de 50 mL de solution-mère de NaOH 1 M :

Peser 2,0 g de NaOH dans un tube à centrifugation de 50 mL et compléter le volume à 50 mL avec de l'eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase). Stériliser par filtration.

Préparer une dilution 1:10 avec de l'eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase) pour obtenir une solution de travail de NaOH 0,1 M.

Note : Cette solution est stable pendant 6 mois à la température ambiante (23 °C ± 3 °C).

10.10 Tampon de conservation des billes-oligo(dT)₂₅

Tris-HCl 250 mM, pH 7,5 (qualité biologie moléculaire commerciale).

EDTA 20 mM (qualité biologie moléculaire commerciale).

Tween 20 0,1 % (qualité biologie moléculaire commerciale).

Azide de sodium (NaN₃) 0,02 % (qualité ACS)

Exemple de préparation de 50 mL de tampon de conservation à partir de solutions commerciales de Tris-HCl 1,0 M, d'EDTA 0,5 M, de Tween 20, de poudre d'azide de sodium et d'eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase) :

$$50 \text{ mL} * \text{Tris-HCl } 0,250 \text{ M, pH } 7,5 = x \text{ mL} * \text{Tris-HCl } 1,0 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 12,5 \text{ mL de Tris-HCl } 0,1 \text{ M}$$

$$50 \text{ mL} * \text{EDTA } 0,020 \text{ M} = x \text{ mL} * \text{EDTA } 0,5 \text{ M}$$

$$x \text{ mL} = 2,0 \text{ mL d'EDTA } 0,5 \text{ M}$$

Ajouter 50 µl de Tween 20.

Ajouter 0,01 g d'azide de sodium (NaN₃)

Ajouter 33,55 mL d'eau distillée stérile (exempte de DNase et de RNase).

Mélanger tous les réactifs dans un tube à centrifugation stérile de 50 mL et répartir en aliquotes de plus petit volume pour la conservation.

Note : Le tampon de conservation est stable pendant 6 mois à la température ambiante (23 °C ± 3 °C).