PCR duplex H5N1av CNR-Vir Institut Pasteur

Développée sur la base du protocole OMS (https://cdn.who.int › default-source › influenza) et en interne

Version du 26/01/2026

Amorces et sondes

- PCR H5a

amorce/sonde	sequence	concentration finale
GRavH5-1063Fw	5'-TTTATAGAGGGAGGATGG-3'	500 nM
GRavH5-1162dRv	5'-GGGTGGATTCTTTGTCTG-3'	250 nM
GRavH5-1162fRv	5'-GAGTAGATTCTTTGTCTG-3'	250 nM
GRavH5-1088bProbe(+) HEX	5'-HEX-TGGTTGATGGTTGGTATGGG-BHQ-1-3'	200 nM
GRavH5-1544bFw	5'-CCTCAGTATTCAGAAGAAGC-3'	500 nM
GRavH5-1683bRv	5'-AGACCAGCYAYCATGATTGC-3'	500 nM
GRavH5-1638cProbe(-) FAM	5'-FAM-AGTGCTAGRGAACTTGCMGCTGTTG-BHQ-1-3'	200 nM
GRavH5-1638dProbe(-) FAM	5'-FAM-AGCACTAGGGAACTCGCCACTGTTG-BHQ-1-3'	200 nM

Taille de l'amplicon **GravH5(1)** : 99 paires de bases
Taille de l'amplicon **GravH5(2)** : 139 paires de bases
Les changements ou ajouts par rapport à la version précédente (du 8/11/2024) sont indiqués en rouge

- PCR N1a

amorce/sonde	sequence	concentration finale
GRavN1-459**b**Fw	5' - **A**TTTGAGTCTGTTGCTTGGTC - 3'	500 nM
GRavN1-648**b**Rv	5' - GCCATTTAC**G**CA**C**GCACATTCAG - 3'	500 nM
GRavN1-493**c**Probe(+) (FAM)	5'-FAM-CATGATGGCAYYAGTTGG**Y**TGACAA BHQ-1 - 3'	200 nM

Taille de l'amplicon **GravN1** : 189 paires de bases
Aucun changement pour la RT-PCR N1a par rapport à la version précédente (du 08/11/2024)

Composition du mix

Concentration des amorces 500nM pour chacune sauf pour GRavH5-1162d et f, qui sont chacune à 250 nM final
Concentration des sondes 200nM pour chacune

Protocole avec le mix Superscript III RT/Platinum à titre indicatif. Echantillon 5µL.

Réactifs pour mix H5a	Volumes (µL)
H_20	1,16
Reaction Mix (2X)	10,00
MgSO4 (50 mM)	0,24
GRav-H5-1063Fw (20 µM)	0,50
GRavH5-1162dRv (20 µM)	0,25
GRavH5-1162fRv (20 µM)	0,25
GRavH5-1544bFw (20 µM)	0,50
GRavH5-1683bRv (20 µM)	0,50
GRavH5-1088bProbe(+) HEX (10 µM)	0,40
GRavH5-1638cProbe(-) FAM (10 µM)	0,40
GRavH5-1638dProbe(-) FAM (10 µM)	0,40
Superscript III RT/Platinum Taq Mix (2UI/µL)	0,40

Les changements et ajouts par rapport à la version précédente (du 8/11/2024) sont indiqués en rouge

Réactifs pour mix N1a	Vol. (µL)
H_20	2,96
Reaction mix (2X)	10,00
MgSO4 (50mM)	0,24
Forward (20µM)	0,50
Reverse (20µM)	0,50
Sonde (10µM)	0,40
Superscript III RT/Platinum Taq Mix (2UI/µL)	0,40

Aucun changement pour la RT-PCR N1a par rapport à la version précédente (du 08/11/2024)

Programme (identique pour la H5a et N1a)

Etapes	Températures (°C)	Durée	Nombre cycles	Mesure
RT	45	00:15:00	1	
Dénaturation	95	00:03:00	1	
Amplification	95	00:00:10	50	Acquisition
	55	00:00:10		
	72	00:00:20		
Cooling	40	00:00:30	1	

Toutes les amorces et sondes décrites ont été validées sur nos équipements :

- *LightCycler480 (Roche)*
- *QuantStudio5 (Thermofisher)*

Ce protocole est à revalider sur vos équipements dans vos conditions de manipulation.

Contrôle positif

Un ARN synthétique H5N1av (non MOT) est disponible sur demande auprès du CNR-Vir Institut Pasteur