

PCR duplex H5N1av CNR-Vir Institut Pasteur.

Développée sur la base du protocole OMS (<https://cdn.who.int/default-source/influenza>)

Version du 8/11/2024

Amorces et sondes

– PCR H5a

GRavH5-1063Fw	5' – TTTATAGAGGGAGGATGG – 3'
GRavH5-1162dRv	5' – GGGTGGATTCTTTGTCTG – 3'
GRavH5-1088bProbe(+) (HEX)	HEX – 5' – TGGTTGATGGTTGGTATGGG – 3' – BHQ-1
GRavH5-1544bFw	5' – CCTCAGTATTCAGAAGAAGC – 3'
GRavH5-1683bRv	5' – AGACCAGCYAYCATGATTGC – 3'
GRavH5-1638cProbe(-) (FAM)	FAM – 5' – AGTGCTAGRGAAGCTGCMGCTGTTG – 3' – BHQ-1

Taille de l'amplicon **GravH5(1)** : 99 paires de bases // Taille de l'amplicon **GravH5(2)** : 139 paires de bases

– PCR N1a

GRavN1-459bFw	5' – ATTTGAGTCTGTTGCTTGGTC – 3'
GRavN1-648bRv	5' – GCCATTTACGCACGCACATTTCAG – 3'
GRavN1-493cProbe(+) (FAM)	FAM – 5' – CATGATGGCAYYAGTTGGYTGACAA – 3' – BHQ-1

Taille de l'amplicon **GravN1** : 189 paires de bases

Composition du mix

Concentration des amorces 500nM pour chacune

Concentration des sondes 400nM pour chacune

Protocole avec le mix Superscript III RT/platinum pour information.

Réactifs	Volumes (µL)
H ₂ O	1,56
Reaction Mix (2X)	10,00
MgSO ₄ (50 mM)	0,24
Forward 1 (20 µM)	0,50
Reverse 1 (20 µM)	0,50
Forward 2 (20 µM)	0,50
Reverse 2 (20 µM)	0,50
Sonde 1 (10 µM)	0,40
Sonde 2 (10 µM)	0,40
Superscript III RT/Platinum Taq Mix (2UI/µL)	0,40

Programme

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