

Jan 05, 2024

Conseils sur l'utilisation de contrôles d'analyse pour la détection directe des poliovirus par séquençage des nanopores

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8pxbrg2w/v1

Joyce Akello¹, Manasi Majumdar², Alex Shaw¹, Catherine Troman¹, Javier Martin², Nick Grassly¹, Erika Bujaki³

¹Imperial College London; ²Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; ³MHRA

Poliovirus Sequencing C...



Shannon Fitz

Imperial College London

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

[Create free account](#)

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8pxbrg2w/v1>

Document Citation: Joyce Akello, Manasi Majumdar, Alex Shaw, Catherine Troman, Javier Martin, Nick Grassly, Erika Bujaki 2024. Conseils sur l'utilisation de contrôles d'analyse pour la détection directe des poliovirus par séquençage des nanopores. [protocols.io https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8pxbrg2w/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8pxbrg2w/v1)

License: This is an open access document distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Created: January 05, 2024

Last Modified: April 20, 2024

Document Integer ID: 92976

Keywords: le test ddn

Funders Acknowledgements:

Bill and Melinda Gates Foundation

Abstract

Ce document décrit le processus de laboratoire pour l'utilisation de contrôles d'analyse (contrôles positifs et négatifs) pour effectuer la détection directe du poliovirus par séquençage des nanopores (le test DDNS).

Troubleshooting

Conseils sur l'utilisation de contrôles d'analyse pour la détection directe des poliovirus par séquençage des nanopores

L'objectif

Décrire les étapes clés de la méthode et du moment d'utiliser les contrôles d'exécution pour le test DDNS, y compris la préparation, le stockage, et l'interprétation des résultats. Les contrôles d'exécution sont utilisés pour démontrer que l'ensemble du flux de travail DDNS, depuis l'extraction de l'ARN jusqu'à l'obtention d'une séquence, est exécuté avec succès.

Formulaires et documents associés

- Protocole DDNS v2.0 ([DDNS protocol v \(protocols.io\)](#))
- Métadonnées DDNS et contrôles de qualité
- Foire aux questions sur la détection directe du poliovirus et le séquençage des nanopores (DDNS) ([Poliovirus direct detection and nanopore sequencing \(DDNS\) FAQs \(protocols.io\)](#))

Réactifs

- Virus Coxsackie A20 – (Fourni par NIBSC, contacter le Dr Manasi Majumdar à manasi.majumdar@mhra.gov.uk et copiez le Dr Javier Martin à javier.martin@mhra.gov.uk)
- Eau sans nucléases (NFW)
- Réactifs d'extraction d'ARN (il est recommandé d'utiliser le kit MagMAX Viral RNA Isolation effectué manuellement ou automatiquement [ThermoFisher], le kit QIAamp Viral RNA [Qiagen] ou le kit Roche High Pure Viral RNA avec protéinase K [Roche])

Équipements

- Poste de sécurité microbiologique, classe II (MSCII)
- EPI (gants, blouse de laboratoire)
- Mélangeur de vortex
- Centrifugeuse de paillasse
- Tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml, sans DNase/RNase
- Pipettes étalonnées monocanal (0,2µl à 1000µl)
- Embouts de pipettes stériles avec filtres (10-1000 µl)
- Congélateur surveillé par tendance, -20°C et réfrigérateur, 4°C
- Élimination Pot « sweetie » ou poubelle biologique Dispo-safe

Procédure

Les contrôles positifs et négatifs subiront tous deux toutes les étapes depuis l'extraction de l'ARN de l'échantillon, l'amplification PCR jusqu'au séquençage des nanopores exécuté en parallèle avec les échantillons. Il s'agit de garantir que l'ensemble du flux de travail DDNS est surveillé pour détecter toute contamination croisée, tout échec de l'extraction d'ARN, de l'amplification PCR et du séquençage.

Contrôle positif:

- Contenu: CVA20 connu pour s'amplifier dans la RT-PCR PanEV et la PCR VP1 imbriquée
- L'objectif:
 - Démontrer que la méthode DDNS est réalisée avec succès et donne le niveau attendu de sensibilité et de spécificité tel que caractérisé lors de l'optimisation technique.
 - Confirme que les résultats négatifs sont exacts.

Contrôle négatif:

- Contenu : Eau sans nucléase (NFW) connue pour ne pas s'amplifier dans la RT-PCR PanEV et la PCR VP1 imbriquée
- L'objectif:
 - Vérifiez les signaux non spécifiques et les résultats faussement positifs.

Exécutez la préparation, le stockage et l'utilisation des contrôles.Reconstitution du contrôle positif CVA20

Remarque: Le contrôle positif CVA20 doit être reconstitué avant utilisation. Aucune tentative ne doit être faite pour peser le matériau lyophilisé.

Matériel infectieux – Manipuler le virus dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe II (MSCII)



1. En travaillant dans le MSCII, reconstituez le flacon contenant le CVA20 lyophilisé (matériau lyophilisé) en ajoutant 1 ml d'eau sans nucléase (NFW).



Contrôle positive CVA20 lyophilisé

2. Vortexez brièvement pour vous assurer que le matériau se dissout complètement dans l'eau, donnant un liquide incolore.



Contrôle positif CVA20 reconstitué dans 1 mL d'eau sans nucléase

3. Aliquoter la solution en volumes à usage unique de 30 µL dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 ml (sans DNase/RNase) et conserver toutes les aliquotes à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

Remarque: L'opérateur doit étiqueter les tubes avec la date à laquelle le contrôle positif a été reconstitué.

Les aliquotes du CVA20 remis en suspension peuvent être conservées à -20°C pendant 5 semaines maximum. L'Aliquotage réduira le risque de contamination de la source et aidera à préserver la stabilité de la solution CVA20 en réduisant le nombre de cycles de gel-dégel de la solution entière.

Utilisation du contrôle d'extraction positif (CVA20) et du contrôle d'extraction négatif lors de l'extraction de l'ARN.

Remarque: Incluez un contrôle d'extraction positif et un contrôle d'extraction négatif pour chaque lot d'extraction d'ARN avec de nouvelles préparations de solutions.

4. Préparez le contrôle d'extraction positif CVA20 pour l'extraction de l'ARN comme suit:

- a. Récupérer une aliquote de 30 µL du CVA20 du congélateur à -20°C.
- b. Laisser décongeler à température ambiante dans l'armoire MSCII
- c. Centrifuger brièvement pendant 5 secondes.
- d. Ajouter 270 µL de NFW et pipeter de haut en bas pour mélanger la solution. La solution est maintenant prête pour une extraction immédiate de l'ARN.



Remarque: Il est de la responsabilité de l'opérateur de vérifier que le contrôle positif du lot est ajouté au processus.

5. Préparez le contrôle d'extraction négatif comme suit:

- a. Aliquoter 300 µl d'eau sans nucléase dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 ml (sans DNase/RNase) étiqueté ExNTC (contrôle négatif d'extraction)



6. Effectuez l'extraction d'ARN des échantillons en parallèle avec les contrôles positifs et négatifs.

7. Les élues/ARN purifiés des contrôles et des échantillons suite à l'extraction de l'ARN peuvent maintenant être traités selon le protocole DDNS.

Remarque: Les élues/ARN purifiés doivent être conservés sur la glace après l'extraction et pendant le travail. Si l'ARN élue n'est pas destiné à une utilisation immédiate, conserver à - 80 °C.

Exécutez la validation des contrôles.

Les produits PCR des contrôles d'analyse peuvent être vérifiés avant le séquençage pour garantir que les étapes d'extraction de l'ARN et d'amplification PCR ont fonctionné efficacement. La vérification des produits PCR de contrôle peut être effectuée à l'aide du système Agilent TapeStation ou de l'électrophorèse sur gel. Pour que l'extraction d'ARN de l'échantillon et le test d'amplification PCR soient acceptés comme valides, les résultats PanEV RT-PCR et Nested VP1 PCR pour les contrôles d'extraction positifs et négatifs ainsi que le contrôle PCR sans matrice doivent être des résultats exceptés tels que résolus et visualisé par la TapeStation ou par électrophorèse sur gel (voir figure 1 ci-dessous).

Pour que les contrôles répondent aux exigences de CQ et valident chaque analyse DDNS, reportez-vous aux métadonnées DDNS et au document QC pour obtenir des directives.

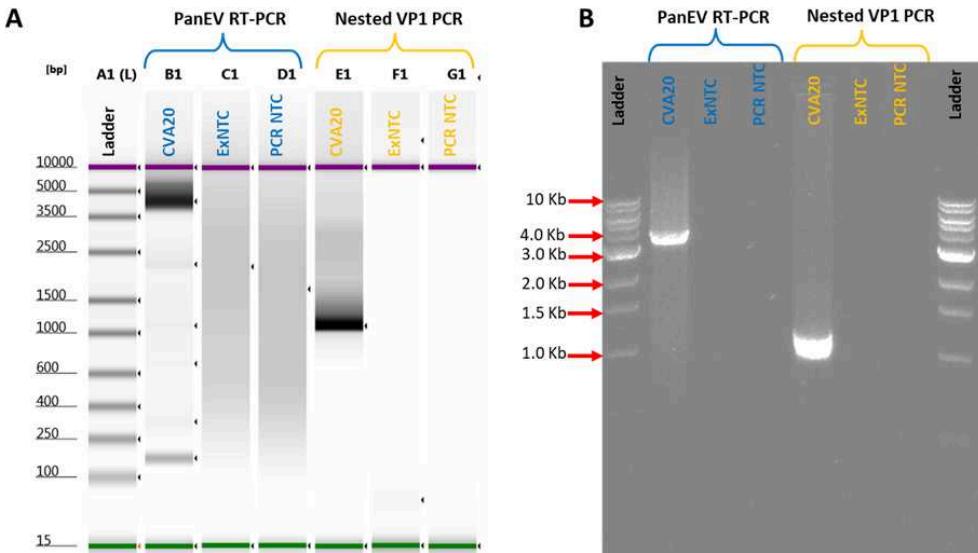


Figure 1. Résultats de Tapestation pour les contrôles du test DDNS des produits PanEV RT-PCR et PCR VP1 imbriqués (panneau A) et résultats de l'électrophorèse sur gel pour les contrôles du test DDNS de PanEV RT-PCR et des produits PCR VP1 imbriqués (panneau B). Le contrôle d'extraction positif étiqueté CVA20 avec une bande PanEV RT-PCR à environ 4,2 kb et une bande PCR VP1 imbriquée à environ 1,2 kb. Le contrôle d'extraction négatif sous forme d'ExNTC sans bande dans la RT-PCR PanEV et la PCR VP1 imbriquée. La PCR sans contrôle de matrice comme la PCR NTC sans bande dans la PanEV RT-PCR et la PCR VP1 imbriquée. Ladder = marqueur de taille. Nested = imbriquée.