



ODIN

RENFORCER LA SURVEILLANCE
ENVIRONNEMENTALE POUR PROMOUVOIR LES
ACTIONS DE SANTÉ PUBLIQUE EN AFRIQUE

D2.3 : Manuel du laboratoire ODIN

—

Procédures opérationnelles standard pour le
prétraitement des échantillons environnementaux,
l'analyse des agents pathogènes et le séquençage du
génomme entier



Financé par l'Union
européenne

Fiche d'information sur le livrable

Acronyme du projet	ODIN
Titre du projet	RENFORCER LA SURVEILLANCE ENVIRONNEMENTALE POUR PROMOUVOIR LES ACTIONS DE SANTÉ PUBLIQUE
Numéro du projet	101103253
Numéro WP	2
Bénéficiaire principal	THL
Titre du livrable	Manuel du laboratoire ODIN - Procédures opérationnelles standard pour le prétraitement des échantillons environnementaux, l'analyse des agents pathogènes et le séquençage du génome entier
Numéro du livrable	D2.3
Type de livrable	Manuel du laboratoire
Niveau de diffusion	Public
Auteur(s)/Autrice(s) :	Haider Al-Hello (THL, Finlande), Outi Nyholm (THL, Finlande), Tarja Pitkänen (THL, Finlande), Elisa Salmivirta (THL, Finlande), Anni Vainio (THL, Finlande), Kristiina Valkama (THL, Finlande), Vito Baraka (NIMR, Tanzanie), Eric Lyimo (NIMR, Tanzanie), Steven Mnyawonga (NIMR, Tanzanie), Edward Msoma (NIMR, Tanzanie), Hillary Sebukoto (NIMR, Tanzanie), Modest Chuwa (NPHL, Tanzanie), Jackson Claver (NPHL, Tanzanie), Ibrahim Mauki (NPHL, Tanzanie), Nyambura Moremi (NPHL, Tanzanie), Zakaria Garba (IRSS-DRCO, Burkina Faso), Palpougouini Lompo (IRSS-DRCO, Burkina Faso), Yougbaré Sibidou (IRSS-DRCO, Burkina Faso), Marc

	<p>Tahita (IRSS-DRCO, Burkina Faso), Melissa Kabena Kabengele (UNIKIN, RDC), Vivi Maketa (UNIKIN, RDC), Evodie Ngelesi (UNIKIN, RDC), Mays Kisala (INRB Kinshasa, RDC), Brigitte Modadra Madakpa (INRB Goma, RDC), Tavia Bodisa Matamu (INRB Goma, RDC), Marie-Anne Kavira Muhindo (INRB Goma, RDC), Michel Ngimba (INRB Goma, RDC), Pascal Kabuyaya Nzoloka (INRB Goma, RDC), Esperance Tsiwedi Tsilabia (INRB Goma, RDC).</p>
<p>Rédactrice :</p>	<p>Outi Nyholm (THL, Finlande)</p>
<p>Comment citer</p>	<p>Nyholm O, Valkama K, Al-Hello H, Salmivirta E, Vainio A, Lyimo E, Mnyawonga S, Msoma E, Sebukoto H, Chuwa M, Claver J, Mauki I, Moremi N, Garba Z, Lompo P, Sibidou Y, Kabengele M, Ngelesi E, Kisala M, Madakpa B, Matamu T, Muhindo M-A, Ngimba M, Nzoloka P, Tsilabia E, Baraka V, Maketa V, Tahita M, Pitkänen T. Manuel du laboratoire ODIN - Procédures opérationnelles standard pour le pré-traitement des échantillons environnementaux, l'analyse des agents pathogènes et le séquençage du génome entier. Nyholm O (rédactrice), The Global Health Network, 2024.</p>

Table des matières

1. Introduction	5
2. Prélèvement de l'échantillon et envoi au laboratoire	6
2.1 Précautions de biosécurité lors de l'échantillonnage.....	6
2.2 Étiquetage et remplissage du formulaire de collecte d'échantillons	6
2.3 Collecte d'échantillons.....	7
2.4 Transport et conservation des échantillons	10
3. Exigences relatives aux laboratoires et à la sécurité du travail en laboratoire.....	11
3.1 Travailler dans le laboratoire de niveau de biosécurité 2 avec des échantillons d'eaux usées	11
4. Analyses microbiologiques basées sur la culture des échantillons environnementaux.....	12
4.1 Dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale (BIF)	13
4.2 Détection, dénombrement et isolement de <i>Vibrio cholerae</i>	15
4.3 Détection et isolement sélectif de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérotype Typhi, c'est-à-dire <i>Salmonella</i> Typhi	23
4.4 Détection, dénombrement et isolement des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et de carbapénémases (EPC), <i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
5. Séquençage du génome entier d'isolats bactériens.....	29
5.1 Extraction d'ADN à partir d'isolats bactériens.....	29
5.2 Préparation de bibliothèques WGS avec le kit Illumina Nextera XT et séquençage avec l'instrument MiSeq.....	37
5.3 Normalisation de la bibliothèque	43
5.4 Dilution et mise en pool des bibliothèques.....	48
5.5 Préparation de la cartouche de réactifs, utilisation de l'instrument MiSeq et démarrage de l'analyse.....	50
5.6 Assurance qualité des lectures de séquences et du téléchargement des données de séquences.....	51
6. Conservation des données séquentielles	52
7. Références	53
ANNEXES.....	56
ANNEXE A. Formulaire de collecte d'échantillons.....	57
ANNEXE B. Réactifs et équipement de laboratoire pour le WGS bactérien.....	61
ANNEXE C. Maintenance du dispositif MiSeq et cycles d'alimentation	64

Liste des abréviations

RAM	Résistance aux antimicrobiens
UFC	Unité formant colonie
PC	Productrices de carbapénémases
EPC	Entérobactéries productrices de carbapénémases
RDC	la République démocratique du Congo
BLSE	Bêta-lactamase à spectre étendu
BIF	Bactéries indicatrices de contamination fécale
INRB	Institut National de Recherche Biomédicale
IRSS-DRCO	Centre National de la Recherche Technologique et Scientifique
NIMR	Institut national de la recherche médicale
NPHL	Laboratoire national de santé publique de Tanzanie
EPI	Équipement de protection individuelle
SOP	Procédures opérationnelles standard
THL	Institut finlandais pour la santé et le bien-être
UNIKIN	Université de Kinshasa
WGS	Séquençage de génome entier

1. Introduction

Le manuel du laboratoire ODIN fournit des lignes directrices et des procédures opérationnelles standard pour la surveillance environnementale des agents pathogènes qui représentent un fardeau important pour la santé publique dans les pays subsahariens. Ces agents pathogènes prioritaires sont *Vibrio cholerae* toxinogène, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et productrices de carbapénémases (PC). En outre, le nombre de bactéries indicatrices de contamination fécale (BIF) est mesuré à partir des échantillons d'eau afin d'évaluer l'ampleur de la contamination fécale.

Ce manuel comprend :

- Des conseils pour la collecte d'échantillons environnementaux et leur envoi au laboratoire
- Les exigences relatives aux installations, équipement et réactifs des laboratoires de microbiologie environnementale
- Les consignes de sécurité pour la manipulation des échantillons d'eaux usées pendant l'échantillonnage et les travaux de laboratoire
- Les protocoles de prétraitement des échantillons pour chaque matrice d'échantillon
- La méthodologie microbiologique et moléculaire pour la détection et la caractérisation des agents pathogènes prioritaires dans les échantillons environnementaux
- Le protocole pour le séquençage du génome entier (WGS) d'isolats bactériens

Le manuel contient les méthodes harmonisées appliquées pour l'analyse des échantillons environnementaux collectés dans le cadre des recherches du consortium ODIN. Les méthodes normalisées suivantes sont nécessaires pour effectuer les investigations bactériologiques sur la qualité de l'eau et doivent être mises à la disposition des utilisateurs du présent manuel :

- ISO 19458:2006 Qualité de l'eau - Échantillonnage pour l'analyse microbiologique
- ISO 8199:2018 Qualité de l'eau - Exigences générales et lignes directrices pour les examens microbiologiques par culture
- ISO 11133:2014 Microbiologie des denrées alimentaires, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, conservation et essais de performance des milieux de culture
- ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture
- ISO/CD 9308-4 Qualité de l'eau - Dénombrement des bactéries *Escherichia coli* et coliformes - Partie 4 : Méthode par filtration sur membrane pour *Escherichia coli* pour les eaux à forte teneur en bactéries non ciblées (projet actuellement examiné par le comité)
- ISO 7899-2:2000 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane

Les méthodes normalisées suivantes sont fournies à titre d'information générale et ne sont pas nécessaires à la réalisation des investigations bactériologiques sur la qualité de l'eau :

- ISO 9308-1:2014 Qualité de l'eau - Dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes. Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries non ciblées
- ISO 21872-1:2017 Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détermination des Vibrio spp. Partie 1 : Détection des Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae et Vibrio vulnificus potentiellement entéropathogènes
- ISO 19250:2010 Qualité de l'eau - Détection de Salmonella spp.

Les normes ISO peuvent être achetées auprès des associations locales de normalisation, provisoirement même dans les langues locales, ou directement depuis la boutique en ligne ISO.

2. Prélèvement de l'échantillon et envoi au laboratoire

2.1 Précautions de biosécurité lors de l'échantillonnage

Travailler avec des eaux usées peut exposer le personnel de laboratoire à plusieurs risques potentiels pour la santé. Il s'agit notamment de l'exposition à des produits chimiques nocifs, à des agents pathogènes et à des polluants biologiques. Il existe également un risque de blessure physique par glissade ou chute en raison de la manipulation d'équipement et de surfaces humides. Par ailleurs, il est possible d'inhaler des gaz nocifs en l'absence d'une ventilation adéquate.

Les échantillons sont prélevés par le personnel chargé de l'échantillonnage qui prend les précautions nécessaires en matière de biosécurité. Les personnes chargées de l'échantillonnage des eaux usées doivent utiliser des gants jetables, porter des vêtements de protection et des chaussures faciles à nettoyer. Il faut savoir que des aérosols peuvent être projetés ou se former dans l'air à partir d'eaux usées ou d'eau contaminée et que le personnel chargé de l'échantillonnage doit donc porter un masque respiratoire et des lunettes de protection. Les masques respiratoires doivent de préférence être des masques respiratoires jetables de classe FFP3. Avant de commencer la collecte d'échantillons d'eaux usées, l'équipe de terrain doit porter son équipement de protection individuelle.

2.2 Étiquetage et remplissage du formulaire de collecte d'échantillons

Tous les récipients qui seront utilisés pour prélever des échantillons d'eau sont correctement étiquetés avant ou après l'échantillonnage. L'étiquette comprend le nom de l'échantillonneur, les informations sur la localisation du site d'échantillonnage (nom, SIG), la date et l'heure.

L'équipe de terrain prendra des photos du site d'échantillonnage et remplira les formulaires de collecte d'échantillons.

Les informations relatives à chaque échantillon et à chaque événement d'échantillonnage, comme le lieu d'échantillonnage, la date et l'heure d'échantillonnage, la température de l'échantillon d'eau au moment de l'échantillonnage et d'autres observations, sont consignées sur le formulaire de collecte d'échantillons. Si certains événements (inhabituels) sont observés (présence d'huile à la surface de l'eau, pluie, débris fécaux visibles...), l'information doit être consignée dans le formulaire de collecte d'échantillons.

Le formulaire de collecte d'échantillons permettant d'enregistrer les métadonnées relatives à l'échantillon et les conditions environnementales au cours de l'échantillonnage est présenté à l'Annexe A.

2.3 Collecte d'échantillons

Des échantillons d'eau du robinet, d'eau de puits, d'eau de surface et d'eaux usées sont prélevés selon un calendrier d'échantillonnage prédéterminé. Le programme d'échantillonnage définit s'il s'agit d'un échantillon instantané ou d'un échantillon par piégeage comme un échantillon passif. La méthode d'échantillonnage est indiquée sur le formulaire de collecte d'échantillons.

Si les échantillons sont prélevés au robinet, où du chlore résiduel est présent, le produit chimique de désinfection doit être inactivé au moment de l'échantillonnage à l'aide de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$). La désinfection par inactivation chimique est réalisée en ajoutant 1 ml de thiosulfate de sodium à une concentration de 18 mg/ml à un litre de l'échantillon d'eau.

Échantillonnage instantané

Les échantillons d'eau peuvent être prélevés en tant qu'échantillons instantanés dans des bouteilles en plastique stériles conformément à la norme ISO 19458 (ISO 19458:2006 Qualité de l'eau - Échantillonnage pour l'analyse microbiologique). Des exemples de volumes d'échantillons appropriés pour différents types d'échantillons sont présentés dans la Figure 1 et le Tableau 1.

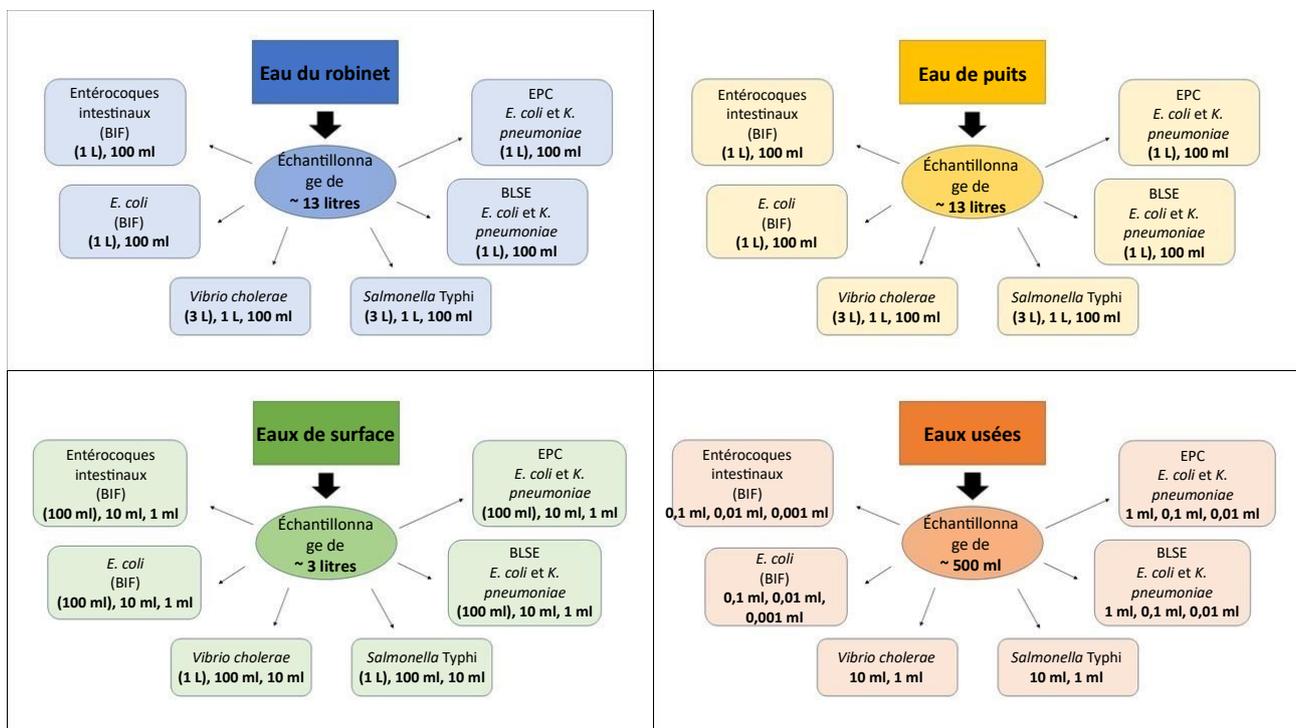


Figure 1. Volumes d'échantillonnage appropriés pour l'eau du robinet, l'eau de puits, l'eau de surface et les eaux usées. Le volume d'échantillon entre parenthèses fait référence au volume d'échantillon qu'il est possible d'utiliser pour augmenter la sensibilité de la méthode si la qualité de l'eau est élevée.

Tableau 1. Volumes d'échantillonnage appropriés pour l'eau du robinet, l'eau de puits, l'eau de surface et les eaux usées (lignes directrices de l'ISO 19458).

Matrice de l'eau	<i>E. coli</i> (BIF)	Entérocoques intestinaux (BIF)	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Salmonella</i> Typhi	BLSE <i>E. coli</i> et <i>K. pneumoniae</i>	EPC <i>E. coli</i> et <i>K. pneumoniae</i>	Au total
Eau du robinet	(1 L) 100 ml	(1 L) 100 ml	(3 L) 1 L 100 ml	(3 L) 1 L 100 ml	(1 L) 100 ml	(1 L) 100 ml	7 (+ 6) L max. ~ 13 L
Eau de puits	(1 L) 100 ml	(1 L) 100 ml	(3 L) 1 L 100 ml	(3 L) 1 L 100 ml	(1 L) 100 ml	(1 L) 100 ml	7 (+ 6) L max. ~ 13 L
Eaux de surface	(100 ml) 10 ml 1 ml	(100 ml) 10 ml 1 ml	(1 L) 100 ml 10 ml	(1 L) 100 ml 10 ml	(100 ml) 10 ml 1 ml	(100 ml) 10 ml 1 ml	~ 3 L
Eaux usées	0,1 ml, 0,01 ml, 0,001 ml	0,1 ml, 0,01 ml, 0,001 ml	10 ml 1 ml	10 ml 1 ml	1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml	1 ml, 0,1 ml, 0,01 ml	~ 500 ml

Échantillonnage passif (piégeage)

Soit les écouvillons de Moore (Rafiee et al. 2021, Liu et al. 2022), soit des échantillonneurs de type « torpille » imprimés en 3D¹ (Schang et al. 2021) sont utilisés comme alternatives à l'échantillonnage instantané des eaux usées. Les échantillonneurs sont faciles à assembler et peuvent être utilisés pour surveiller même de petites zones de captage. Dans le cadre du projet ODIN, des échantillonneurs passifs sont utilisés en plus de l'échantillonnage instantané pour collecter des microbes sur des matériaux absorbants, c'est-à-dire sur des cotons-tiges, et sur des membranes électro-négatives (Figure 2). Le liquide absorbé peut être utilisé pour analyser les indicateurs et les agents pathogènes prioritaires. Les microbes collectés sur des filtres à membrane peuvent être éliminés par des billes d'agitation.

Matériaux

- Échantillonneurs de type « torpille » imprimés en 3D (fichiers de l'imprimante 3D : https://www.bosl.com.au/wiki/Passive_Sampler), le matériau approprié doit résister aux eaux usées et aux processus de décontamination
- Corde (2 à 3 mm d'épaisseur)
- Tissu d'ombrage à enrouler autour de l'échantillonneur (vérifier que l'eau peut passer à travers)
- Poids pour maintenir l'échantillonneur immergé
- Matériau adsorbant pour collecter la biomasse

¹ Lien de téléchargement pour les fichiers de l'imprimante 3D (https://www.bosl.com.au/wiki/Passive_Sampler)

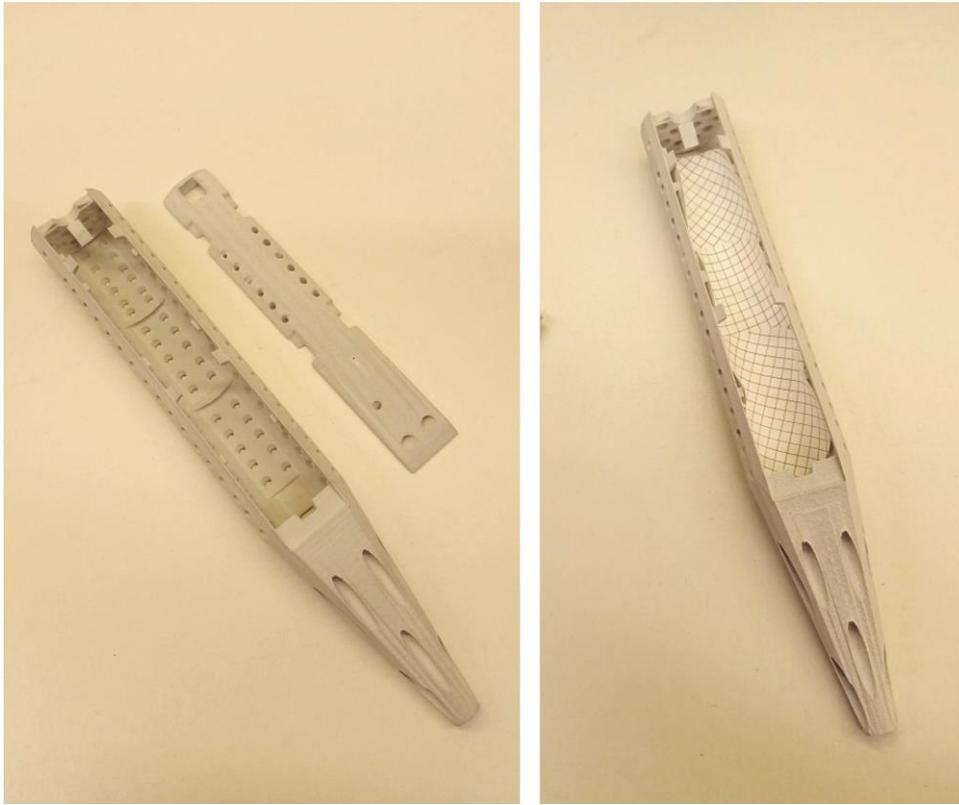


Figure 2. Échantillonneur passif de type « torpille » vide (à gauche) et avec des membranes de 0,45 μm à l'intérieur (à droite).
Photos : THL.

Un échantillonneur est équipé d'un poids pour le maintenir immergé et d'un emballage supplémentaire pour réduire la collecte de matières solides (Figure 3)². Le premier jour, l'échantillonneur est ancré dans le système d'égouts (station de pompage, regard, flux d'eaux usées) et collecté après 24 heures le deuxième jour. Le cas échéant, des délais de collecte plus courts ou plus longs peuvent être utilisés.

Les échantillonneurs de type « torpille » récupérés sont emballés dans un double sac en plastique et transportés dès que possible dans des glacières dotées de blocs réfrigérants jusqu'au laboratoire où les échantillonneurs sont démontés³. Les filtres sont placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml à l'aide de pinces stériles et conservés au congélateur avant l'extraction des acides nucléiques. Le liquide contenu dans les tampons absorbants (par exemple, les cotons-tiges) est pressé et utilisé pour l'analyse de la culture.

² Fabrication d'un échantillonneur passif <https://youtu.be/gG4pA318JJU>

³ SOP de démantèlement passif de type « torpille » <https://youtu.be/pTXiuIZYgmU>



Figure 3. Échantillonneur de type « torpille » entièrement assemblé avec le poids (à gauche) et l'emballage supplémentaire avec le tissu d'ombrage (à droite). Photos : THL.

2.4 Transport et conservation des échantillons

Si les échantillons ne sont pas transportés immédiatement, ils doivent être conservés à 5 ± 3 °C conformément à la norme ISO 19458.

Juste avant le transport, les échantillons sont emballés dans des glacières avec des blocs réfrigérants congelés. Chaque glacière doit contenir suffisamment de blocs réfrigérants congelés pour maintenir une température froide pendant le transport. Plusieurs conteneurs d'échantillons ou échantillonneurs passifs peuvent être transportés dans une seule glacière. Dans ce cas, il faut veiller à ce qu'il y ait suffisamment de blocs réfrigérants dans la glacière. Toutefois, les échantillons d'eau propre (eau du robinet, eau de puits) doivent être conservés et transportés séparément des échantillons d'eaux usées. Les blocs réfrigérants sont disposés autour des conteneurs d'échantillons ou des échantillonneurs passifs afin de maintenir l'échantillon aussi froid que possible tout au long du transport. Par exemple, un film à bulles peut être placé entre les conteneurs d'échantillons et les blocs réfrigérants pour éviter que les échantillons ne gèlent pendant le transport.

Les conteneurs d'échantillons et les échantillonneurs passifs doivent être transportés au laboratoire dès que possible, au plus tard dans les 24 heures, à une température de 5 ± 3 °C (dans des glacières avec des blocs réfrigérants congelés). La température de transport de l'échantillon peut être contrôlée à l'aide d'un enregistreur de données de température fixé à la glacière. Un enregistreur de données peut être collé, par exemple, sur le couvercle de la glacière pour mesurer la température à l'intérieur de la glacière pendant le transport. La température de l'eau doit être mesurée pendant l'échantillonnage et immédiatement après le transport, lorsque les échantillons arrivent au laboratoire. Il est important que la température ne soit pas mesurée directement à partir du flacon à échantillons, mais à partir d'un récipient séparé (d'une aliquote d'échantillon), car le capteur de température n'est pas stérile. Les mesures de température sont effectuées à deux reprises : au moment de l'échantillonnage et à l'arrivée de l'échantillon au laboratoire. Les étapes de la mesure de la température sont les suivantes :

1. Mélanger l'échantillon d'eau dans le récipient d'échantillonnage (flacon).
2. Verser avec précaution au moins 5 ml de l'échantillon dans une fiole ou un tube séparé.
3. Mesurer immédiatement la température de l'eau à partir de cette petite sous-fraction de l'échantillon.
4. Enregistrer la température sur la feuille de données d'échantillonnage.

Après le transport, à l'arrivée au laboratoire, les laboratoires enregistrent l'heure d'arrivée et la température des échantillons sur le formulaire de collecte d'échantillons (Annexe A). Les échantillons doivent être conservés à 5 ± 3 °C pendant 24 h au maximum, si l'analyse de l'échantillon n'est pas lancée immédiatement.

3. Exigences relatives aux laboratoires et à la sécurité du travail en laboratoire

La norme internationale ISO 8199 (ISO 8199:2018 Qualité de l'eau - Exigences générales et lignes directrices pour les investigations microbiologiques par culture) décrit les exigences de base relatives aux installations de laboratoire, à l'équipement et aux réactifs pour les recherches microbiologiques basées sur la culture à partir d'échantillons d'eau. Il est essentiel que les laboratoires ODIN respectent ces exigences de base.

3.1 Travailler dans le laboratoire de niveau de biosécurité 2 avec des échantillons d'eaux usées

L'objectif des instructions de biosécurité est de fixer les exigences nécessaires à la gestion des risques associés à la manipulation, à la conservation et à l'élimination des agents biologiques et des toxines (CDC 2024a). Les techniciens de laboratoire doivent suivre à la fois les consignes de sécurité du laboratoire et les instructions opérationnelles spécifiques au laboratoire (NIH, 2023). Ces instructions doivent être conçues en fonction des exigences locales (CDC 2024a, NIH 2023, The University of Chicago 2024).

Travailler dans des laboratoires de niveau de biosécurité 2, ou BSL-2, fournit un ensemble de directives et de pratiques visant à minimiser le risque d'exposition à des matières biologiques potentiellement dangereuses. Dans le contexte des eaux usées, le respect des règles de biosécurité garantit la protection du personnel de laboratoire contre les agents pathogènes et autres contaminants susceptibles d'être présents dans les échantillons. Le niveau 2 de biosécurité est essentiel pour prévenir les infections et maintenir un environnement de travail sûr. (NIH 2023, Caburao 2024, CDC 2024a, CDC 2024b, Université de Chicago 2024)

Plusieurs mesures de sécurité essentielles doivent être respectées. Tout d'abord, il faut toujours porter un équipement de protection individuelle (EPI), comme des gants, des blouses de laboratoire et des lunettes de protection. En outre, il est essentiel d'avoir une bonne hygiène des mains, notamment avec un lavage fréquent et l'utilisation de désinfectants pour les mains. Il est également important de travailler dans un

endroit bien ventilé, de désinfecter correctement tous les équipement et toutes les surfaces et éviter ainsi toute contamination croisée. (CDC 2024c, CDC 2024d)

Enfin, tout personnel travaillant dans un laboratoire BSL-2 doit recevoir une formation complète sur les protocoles de biosécurité, y compris la manipulation et l'élimination correctes des échantillons d'eaux usées, la compréhension des dangers et des risques potentiels associés aux échantillons et l'utilisation appropriée des EPI. Des stages réguliers de perfectionnement des connaissances doivent également être organisés pour s'assurer que tout le monde reste informé des dernières directives en matière de sécurité. (Université de Washington 2019, CDC 2024e)

L'évaluation des risques consiste à identifier les dangers survenant au travail, à déterminer l'ampleur des risques causés par ces dangers et à évaluer l'importance de ces risques. L'introduction de nouveaux composants biologiques, le début d'un nouveau protocole dans le laboratoire ou des modifications substantielles dans la procédure du protocole, ainsi que le déménagement dans de nouvelles installations, sont autant d'exemples d'événements qui nécessitent une nouvelle évaluation des risques ou la révision d'une évaluation existante. (Henderson 2009, Environmental Health and Safety 2024)

Après l'évaluation, le lieu de travail décide des mesures nécessaires. L'évaluation des risques doit être adaptée à la nature du risque et préventive, et pas seulement réactive à la situation. Remarque : l'évaluation des risques ne porte pas uniquement sur les questions liées à la manipulation du facteur biologique, mais également sur l'ensemble de l'opération.

L'évaluation des risques est effectuée conformément aux pratiques générales de l'institution, du lieu de travail ou du laboratoire, mais cette évaluation des risques n'est pas nécessairement assez détaillée en termes de biosécurité. Une évaluation des risques biologiques peut être incluse, par exemple, dans une méthode ou des instructions de travail.

Lors de la première étape du processus de gestion des risques biologiques, tous les dangers liés aux risques biologiques sont identifiés et documentés. Les risques biologiques sont évalués en fonction des dommages qu'ils peuvent causer aux humains, aux animaux et à l'environnement. Toutes les personnes participant aux travaux et, si nécessaire, les experts en sécurité et en risques de l'institution, du lieu de travail ou du laboratoire, ainsi que les responsables des services de soutien de l'installation, sont impliqués dans ce processus ou en sont informés. (Université de Washington 2019, NIH 2023, CDC 2024a-e)

4. Analyses microbiologiques basées sur la culture des échantillons environnementaux

Des échantillons d'eau du robinet, d'eau de puits, d'eau de surface et d'eaux usées sont prélevés sur les sites d'étude dans le cadre de la recherche du consortium ODIN. L'analyse des échantillons basées sur la culture doit être lancée dans les 24 heures suivant l'échantillonnage.

Les principes de la norme ISO 8199 sont respectés dans les investigations microbiologiques sur l'eau. Le volume d'échantillon analysé varie en fonction du niveau estimé de contamination fécale des échantillons.

Lorsque des échantillons d'eau du robinet et d'eau de puits sont analysés, 100 ml sont utilisés comme volume d'analyse standard. Toutefois, pour l'analyse des agents pathogènes à partir d'eau propre, il est possible d'utiliser des volumes d'échantillons d'eau de 1 000 ml, voire plus.

Pour les échantillons d'eau de surface, des volumes de 100 ml, 10 ml et 1 ml conviennent généralement à l'analyse. Dans le cas d'eaux de surface fortement contaminées, une série de dilutions peut être nécessaire.

En général, des volumes de 10 ml, 1 ml et une série de dilutions de 10 fois dans un diluant bactériologique sont utilisés pour analyser les échantillons d'eaux usées. Lorsque les eaux usées sont visiblement très troubles (forte concentration de matières organiques), une dilution est nécessaire pour obtenir une croissance uniforme des colonies.

4.1 Dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale (BIF)

Les bactéries indicatrices de contamination fécale sont utilisées pour évaluer la présence et l'ampleur du niveau de contamination fécale dans les échantillons environnementaux. En outre, la numération des indicateurs de contamination fécale peut être utilisée pour normaliser les résultats des agents pathogènes prioritaires lorsque d'autres informations de normalisation ne sont pas disponibles. La normalisation à l'aide d'indicateurs tient compte des différences dans les niveaux de contamination fécale des échantillons entre les différents moments d'échantillonnage, par exemple en raison des effets de dilution différentiels causés par les précipitations. Les résultats normalisés sans unité peuvent être comparés au fil du temps. Un bon indicateur de contamination fécale est stable dans un échantillon et présente une faible variabilité géographique et saisonnière.

Dénombrement d'*Escherichia coli*

La numération des *E. coli* est analysée à partir des échantillons d'eau en utilisant la méthode par filtration sur membrane selon les principes de la méthode standard ISO/CD 9308-4.

REMARQUE : E. coli est la principale espèce (80 à 90 %) de coliformes fécaux, également appelés coliformes thermotolérants. Les espèces du groupe des coliformes fécaux comprennent, outre E. coli, également Klebsiella, Citrobacter et Enterobacter, qui pourraient aussi avoir des origines environnementales. Nous nous concentrons ici sur le dénombrement sélectif des colonies d'E. coli, l'indicateur le plus connu de la contamination fécale fraîche.

Le contrôle de la qualité des réactifs et des matériaux doit être effectué conformément à la norme ISO 11133 (ISO 11133:2014 Microbiologie des aliments, de la nourriture pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture). La norme ISO 7704 définit des procédures d'assurance qualité pour les filtres à membrane (ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture).

Réactifs, matériaux et équipement

- Membrane filtrante
- Équipement de filtration sur membrane

- Milieu gélosé solide destiné à la culture sélective d'*E. coli*. Il est recommandé d'utiliser un milieu gélosé tryptone-bile-X-glucuronide (TBX) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni).

REMARQUE : l'utilisation de la gélose chromogène pour bactéries coliformes (CCA) conformément à la norme ISO 9308-1 est une alternative pour les systèmes d'eau propre chlorée où la croissance des microbes non ciblés n'est pas un problème. La CCA n'est pas adaptée aux eaux de surface et aux eaux usées (ISO 9308-1:2014 Qualité de l'eau - Dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes. Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries non ciblées).

- Diluant selon ISO 8199
- Incubateur

Protocole

En utilisant la technique de filtration sur membrane, filtrer l'échantillon d'eau non dilué ou dilué (en fonction du niveau estimé de contamination fécale) à travers une membrane filtrante (Figure 1, Tableau 1). La dilution de l'échantillon est effectuée conformément à la norme ISO 8199. Après filtration, placer la membrane filtrante sur la plaque de gélose sélective et incuber la plaque.

Après incubation, dénombrer les colonies typiques selon les indications du fabricant du milieu de culture.

Calcul et communication des résultats

Si plusieurs volumes d'échantillon ont été analysés, les résultats sont calculés et enregistrés en tant que moyenne pondérée par volume conformément à la norme ISO 8199. Le résultat final pour l'eau du robinet, l'eau de puits et l'eau de surface est exprimé en unités formant colonie (UFC)/100 ml et pour les eaux usées en UFC/ml.

Dénombrement des entérocoques intestinaux

Les entérocoques intestinaux sont analysés conformément à la norme ISO 7899-2 (ISO 7899-2:2000 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane). Auparavant, le paramètre BIF des entérocoques intestinaux était appelé streptocoques fécaux.

Le contrôle de la qualité des réactifs et des matériaux doit être effectué conformément à la norme ISO 11133 (ISO 11133:2014 Microbiologie des aliments, de la nourriture pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture). La norme ISO 7704 définit des procédures d'assurance qualité pour les filtres à membrane (ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture).

Réactifs, matériaux et équipement

- Membrane filtrante
- Équipement de filtration sur membrane
- Milieu gélosé Slanetz & Bartley (S&B) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Milieu gélosé bile-esculine-azide (BEA) (par exemple, Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Diluant selon ISO 8199
- Incubateur

Protocole

En utilisant la technique de filtration sur membrane, filtrer l'échantillon d'eau non dilué ou dilué (en fonction du niveau estimé de contamination fécale) à travers une membrane filtrante (Figure 1, Tableau 1). La dilution de l'échantillon est effectuée conformément à la norme ISO 8199. Après filtration, placer la membrane filtrante sur la plaque S&B et incuber la plaque à (36 ± 2) °C pendant (44 ± 4) heures.

Après incubation, dénombrer les colonies typiques selon les indications du fabricant du milieu de culture. Examiner et dénombrer les colonies typiques en tant qu'entérocoques intestinaux préliminaires. Transférer la membrane filtrante contenant les colonies sur une plaque BEA et incuber la plaque à $(44,0\pm 0,5)$ °C pendant 2 heures pour confirmer que les colonies sont des entérocoques intestinaux.

Calcul et communication des résultats

Si plusieurs volumes d'échantillon ont été analysés, les résultats sont calculés et enregistrés en tant que moyenne pondérée par volume conformément à la norme ISO 8199. Le résultat final pour l'eau du robinet, l'eau de puits et l'eau de surface est exprimé en unités formant colonie (UFC)/100 ml et pour les eaux usées en UFC/ml.

4.2 Détection, dénombrement et isolement de *Vibrio cholerae*

Culture de *Vibrio* spp.

Les *Vibrio cholerae* sont analysés avec une méthode par filtration sur membrane basée sur la culture sélective, suivie d'une identification de l'espèce et de tests de confirmation pour déterminer la présence de souches toxigènes. La méthode est basée sur le protocole du Standing Committee of Analysts, Royaume-Uni, - Partie 9 - Méthodes d'isolement de *Yersinia*, *Vibrio* et *Campylobacter* par enrichissement sélectif. (Standing Committee of Analysts 2016) ; sauf qu'au lieu de l'étape d'enrichissement, la membrane filtrante est placée directement sur le milieu de culture sélectif solide. Les étapes de l'analyse des *Vibrio cholerae* sont décrites dans l'organigramme (Figure 4).

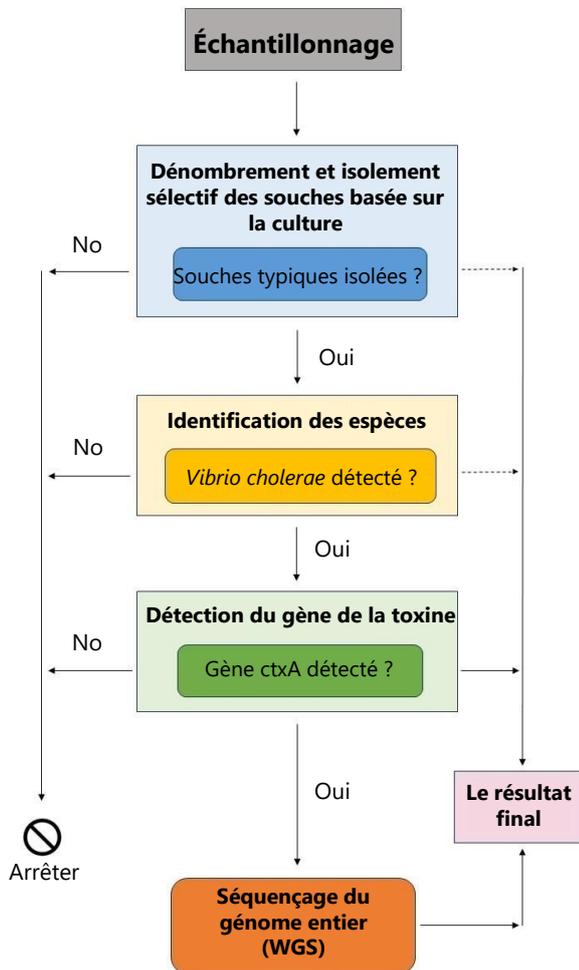


Figure 4. Étapes de la détection et du dénombrement de *Vibrio cholerae*

Vibrio spp. est analysé sans ou avec enrichissement en utilisant la méthode par filtration sur membrane. L'analyse directe avec la méthode par filtration sur membrane sans enrichissement est recommandée, car elle permet l'énumération des nombres de *Vibrio* dans les échantillons. Pour plus d'informations sur l'analyse des *Vibrio* spp. avec enrichissement, voir ISO 21872-1 (ISO 21872-1:2017 Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détermination des *Vibrio* spp. Partie 1 : Détection des *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* potentiellement entéropathogènes).

Le contrôle de la qualité des réactifs et des matériaux doit être effectué conformément à la norme ISO 11133 (ISO 11133:2014 Microbiologie des aliments, de la nourriture pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture). La norme ISO 7704 définit des procédures d'assurance qualité pour les membranes filtrantes (ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture).

Réactifs, matériaux et équipement

- Membrane filtrante
- Équipement de filtration sur membrane
- Milieu gélosé thiosulfate-citrate-bile-saccharose (TCBS) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Diluant selon ISO 8199
- Milieu gélosé non sélectif solide pour la culture pure, par exemple milieu gélosé Tryptone-Soja (TSA) (par exemple Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Incubateur

Protocole sans enrichissement

En utilisant la technique de filtration sur membrane, filtrer l'échantillon d'eau à travers une membrane filtrante (Figure 1, Tableau 1). Après filtration, placer la membrane filtrante sur la plaque TCBS et incuber la plaque à 37 °C pendant 18 à 24 heures.

Après l'incubation, lire les plaques selon les indications fournies par le fabricant du milieu. Les colonies typiques de *Vibrio cholerae* sont généralement jaunes sur le milieu gélosé TCBS, avec une taille de 2 à 3 mm (Figure 5). Également, *Vibrio fluvialis* et *Vibrio metschnikovii* forment des colonies jaunes sur TCBS. Les colonies typiques

de *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio mimicus* ont un aspect allant du bleu au vert avec une taille de colonie de 2 à 5 mm sur TCBS, et *Vibrio vulnificus* a un aspect de colonie verte (Harwood et al. 2004). Les entérocoques et les *Proteus* spp. sont également capables de former des colonies sur le milieu gélosé TCBS, mais ces colonies sont généralement plus petites que les colonies de *Vibrio* spp.

Réaliser des cultures pures à partir de colonies typiques sur des plaques non sélectives, par exemple TSA, et incuber les plaques à (36±2) °C pendant environ 24 heures pour une autre confirmation.

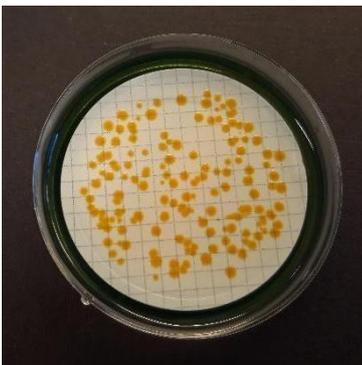


Figure 5. Colonies jaunes de *Vibrio cholerae* sur la plaque TCBS avec une membrane filtrante. Photo : THL.

Méthodes d'identification des espèces des souches de *Vibrio* spp.

Maldi-Tof

Les souches bactériennes sont identifiées à l'aide d'une méthode Maldi-ToF MS (désorption-ionisation laser assistée par matrice - Temps de vol Spectrométrie de masse) selon le guide fourni par le fabricant. La méthode Maldi-ToF est une méthode efficace et fiable pour la spéciation des souches de *Vibrio* spp.

Suivre les instructions du fabricant lors de la lecture des résultats. Il est recommandé d'identifier deux taches parallèles provenant du même isolat. L'identification est considérée comme fiable si la valeur du résultat est comprise entre 2,0 et 3,0.

Les isolats identifiés comme étant de *Vibrio cholerae* sont caractérisés de manière plus approfondie afin de déterminer leur toxigénicité.

Autres méthodes

Lorsque la méthode Maldi-ToF n'est pas disponible, des tests biochimiques, comme API 20E (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) ou VITEK 2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) peuvent être utilisés pour la spéciation des souches de *Vibrio* spp.

Les isolats identifiés comme étant de *Vibrio cholerae* sont caractérisés de manière plus approfondie afin de déterminer leur toxigénicité.

Méthodes de vérification des isolats de *Vibrio cholerae* toxinogènes

La confirmation par PCR de la présence du gène de la toxine cholérique est la principale méthode à utiliser. Il est également possible d'effectuer un sérogroupage avec agglutination d'antisérums de *Vibrio cholerae* O1 et O139.

*PCR conventionnelle pour détecter le gène *ctxA* de *Vibrio cholerae**

Objectif du test : détecter le gène *ctxA* de *Vibrio cholerae*, qui détermine la toxine cholérique.

Principe : la toxine cholérique appartient aux entérotoxines, qui se composent de deux polypeptides. La PCR est utilisée pour amplifier sélectivement une partie (554 pb) du gène *ctxA* de 777 paires de bases (pb) situé dans l'îlot de pathogénicité 1 de *Vibrio* à l'aide d'amorces spécifiques. Les amorces ont été publiées précédemment par Nandi et al. (2000) et la méthode a été mise en place dans le laboratoire de bactériologie de THL.

Échantillon : Culture pure fraîche sur une plaque.

Contrôles : Contrôle positif : isolat de *Vibrio cholerae* *ctxA*-positif

Contrôle négatif : une souche non toxique de *V. cholerae*

Contrôles négatifs pour l'extraction d'ADN et la PCR

L'ADN des souches de l'échantillon et des souches de contrôle est extrait par chauffage. Les ADN extraits sont conservés dans un congélateur à -20 °C et les lots sont utilisés jusqu'à ce qu'ils soient épuisés, que les produits commencent à s'estomper ou que le résultat soit erroné.

Réactifs :

Réactifs PCR :

- Eau stérile sans pyrogène (par exemple, eau de qualité biologie moléculaire HyPure™ du fabricant HyClone), conservée au réfrigérateur (+2...+8 °C), divisée en portions de 1 ml dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml dans la salle de mastermix, et conservée en portions dans le congélateur (en dessous de -18 °C).

- Un kit de PCR multiplexe (par exemple, mélange maître 5× FIREPol® prêt à l'emploi (250 réactions), réf. fab. : 04-11-00125, Solis BioDyne, ou QIAGEN® Multiplex PCR Kit fabriqué par QIAGEN ; réf. fab. : 206143 (100 unités de réaction de 50 µl), 206145 (1 000 unités de réaction de 50 µl), contient :
 - Mélange maître 2× pour PCR multiplexe de QIAGEN (HotStarTaq® ADN polymérase, tampon de PCR multiplexe, mélange de dNTPs)
 - Q-Solution (5x)
 - Eau stérile
 - Conservation au-dessous de -18 °C dans un congélateur
- Amorces (Nandi et al. 2000)
 - ctxAF (5' CTCAGACGGGGATTGTTAGGCACG 3')
 - ctxAR (5' TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG 3')
 - Les amorces sont commandées dissoutes dans de l'eau stérile (100,0 pmol/µl), à partir de laquelle des dilutions de travail de 1:10 sont effectuées (10 µl d'amorce + 90 µl de H₂O stérile).
 - Les solutions de réserve et les dilutions de travail sont conservées au-dessous de -18 °C dans un congélateur.

Réactifs d'électrophorèse sur gel d'agarose :

- Agarose, par exemple agarose SeaKem-LE (Lonza), VWR : 50004 (500g)
 - Conservation à température ambiante
- Tampon TBE 5× (Tris-borate-EDTA)
 - Une solution de travail de 0,5×TBE est préparée en la diluant à 1:10 dans de l'eau purifiée
 - Conservation à température ambiante
- Colorant de charge 6× – tampon d'échantillon (0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % xylène cyanol FF, 15 % Ficoll 400)
 - Conservation au réfrigérateur (+2...+8 °C)

REMARQUE : Le mélange maître 5× FIREPol® est déjà coloré et il n'est pas nécessaire d'ajouter un colorant de charge si ce produit est utilisé pour la PCR.
- Marqueur de taille, par exemple GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (100 à 3 000 pb), ThermoFisher # SM0322 (5×50 µg)
 - Conserver au-dessous de -18 °C dans un congélateur.
 - Le tube fonctionnel est conservé au réfrigérateur (+2...+8 °C).
- SYBR Safe 10 000 X (S33102, Invitrogen)
 - Conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière
 - Expiration 6 mois après ouverture du tube de réactif
 - Solution de travail 1X (diluée dans le tampon TBE) conservation au réfrigérateur (+2...+8 °C) - la solution de travail reste bonne pendant une semaine

Équipement, instruments et fournitures :

- Tubes Eppendorf stériles en plastique de 1,5 ml et 0,5 ml
- Pipettes
- Pointes de pipettes filtrantes

- Gants de protection en nitrile
- Glace pilée
- Fiole Erlenmeyer de 250 ml
- Four à micro-ondes
- Machine PCR
- Équipement pour l'analyse des gels d'agarose (plateau de coulage de gel, peigne à dents, dispositif d'analyse et alimentation électrique)
- Caméra et dispositif d'imagerie pour gel UV
- Centrifugeuse Eppendorf
- Réfrigérateur (+2...+8 °C)
- Congélateur en dessous de -18 °C
- Mélangeur d'éprouvettes (Vortex)

Exécution des travaux :

1. Prétraitement de l'échantillon (modèle)
 - Prélever 1 à 2 colonies sur la plaque
 - Suspender l'échantillon dans 150 µl de NaCl à 0,9 %
 - Centrifuger pendant 5 minutes à 3 000 tours/minute
 - Faire bouillir l'échantillon ou le maintenir dans un bloc chauffant à 100 °C pendant 10 minutes
 - Centrifuger l'échantillon pendant 10 secondes à 3 000 tours/minute.
 - Maintenir les tubes dans un bain frais/de glace pendant la préparation du Master Mix.
 - Préparer également un tube de contrôle pour l'extraction d'ADN dans lequel aucune bactérie n'est ajoutée
2. Réaction PCR
 - Calculer la quantité requise de Master Mix : échantillons, contrôles, contrôle de l'isolement de l'ADN, contrôle de l'eau du Master Mix et 1 pipette de rechange, utiliser un formulaire d'analyse dans Excel par exemple.
 - Master Mix pour un échantillon :

Réactif	Volume par réaction (µl)
H2O stérile apyrogène	8,0
Q-solution	2,5
Amorce ctxAF 126 (concentration de travail 10 pM)	1,0
Amorce ctxAR 127 (concentration de travail 10 pM)	1,0
2xQiagen MM	12,5

Total	25
-------	----

- Préparer le Master Mix et distribuer 25 µl dans les tubes.
- Ajouter le modèle 1 µl / tube, volume final dans le tube PCR 26 µl.
- Démarrer le programme PCR.

Programme PCR :

Étape	Temp.	Temps
1.	95 °C	15 min
2.	94 °C	30 secondes
3.	60 °C	90 secondes
4.	72 °C	92 secondes
5	-	Revenir à l'étape 2. 30 fois
6.	72 °C	10 min
7.	4 °C	∞
8.	-	Le programme se termine

3. Électrophorèse sur gel d'agarose :

- Analyser les produits PCR sur un gel d'agarose à 1,5 % à 2 %.
- Marqueur de masse moléculaire GeneRuler 100 pb, pipeter 3 µl du mélange préparé.
- Si le mélange maître n'est pas déjà coloré, ajouter 3 µl de tampon de colorant de charge 6x au produit PCR. Pipeter 10 µl du mélange sur le gel.
- Conditions d'analyse du gel : 50 à 60 min, 120 à 140 V.
- Coloration avec Sybr Safe et image avec Alphamager.
 - Pour préparer la solution de coloration, diluer le réactif Sybr Safe 10 000x à une concentration 1x à l'aide du tampon TBE 0,5x (solution de travail). Préparer une quantité suffisante de la solution de coloration 1x pour immerger complètement le gel. Par exemple, 10 µl de Sybr Safe 10 000x pour 100 ml de tampon TBE 0,5x.
 - Protocole de coloration : immerger le gel dans la solution de coloration et incubé pendant 30 minutes. Si possible, agiter le gel sur un agitateur orbital à 50 tours/minute ou secouer doucement le plateau de coloration du gel plusieurs fois pendant la période d'incubation. Après incubation, le gel est prêt pour l'imagerie.
 - Les gels colorés avec Sybr Safe peuvent être éliminés comme des déchets normaux.

Interprétation des résultats et critères d'acceptation :

Les résultats des échantillons sont comparés aux souches de contrôle et aux marqueurs moléculaires. Si la souche possède le gène *ctxA* de *Vibrio cholerae*, un produit de 301 pb est amplifié dans la PCR. Si l'échantillon ne forme pas un produit de taille correcte, la souche ne possède pas le gène *ctxA*. Le contrôle positif doit être positif, et les contrôles négatifs doivent être négatifs pour que le résultat soit accepté. Dans le cas contraire, le test sera répété.

Les réactions PCR utilisent plusieurs réactifs et comportent de nombreuses étapes de travail, donc la méthode est sujette à des erreurs. Les méthodes PCR présentent également un risque élevé de contamination, que l'on tente de minimiser en utilisant des espaces de travail séparés pour les travaux de PCR, en veillant à la propreté des espaces et des réactifs, et en utilisant un contrôle négatif dans les réactions PCR. Si un produit PCR est amplifié dans le contrôle négatif, l'ADN est à nouveau isolé et la réaction est répétée en utilisant de nouveaux lots de réactifs.

Sérogroupage à l'aide d'antisérums

Objectif du test : Définir le sérotype O d'un isolat de *Vibrio cholerae*.

Principe : Il existe plus de 100 sérotypes O différents de *V. cholerae*. Deux d'entre eux, O1 et O139, peuvent provoquer le choléra épidémique. Les souches de *V. cholerae* qui ne sont pas du sérotype O1 ou O139 (appelées communément non-O1, non-O139) sont courantes dans les eaux marines et saumâtres et dans les mollusques et crustacés. Comme d'autres espèces du genre *Vibrio*, elles sont généralement inoffensives, mais peuvent provoquer, par exemple, des diarrhées, des infections de l'oreille et des infections de plaies. Tous les isolats de *Vibrio* suspectés d'être *V. cholerae* sont soumis à la détermination du sérotype (O1, O139) par agglutination antigène-anticorps sur des lames de verre à l'aide d'antisérums commerciaux.

Échantillon : Culture pure fraîche sur un milieu non sélectif tel que la gélose au sang.

Réactifs :

- Plaque non sélective, par exemple TSA ou gélose au sang
- 0,9 % et 4 % de NaCl
 - Pour déterminer des formes grossières
 - Conservation au réfrigérateur dans des flacons en plastique, 1,5 ml/flacon
 - Reste utilisable pendant plusieurs mois
- Antisérums (par exemple, Denka Seiken Co, LTD, Tokyo, Japon)
 - Antisérum du groupe polyvalent O1
 - En option : antisérum O1 Ogawa
 - En option : antisérum O1 Inaba
 - Antisérum O139 (Bengal)
 - Pré-dilué pour utilisation
 - Date de péremption indiquée sur les flacons
 - Peut également être utilisé après la date de péremption si les souches de contrôle fonctionnent
 - Conservation au réfrigérateur

Contrôles : Souches de contrôle positif *V. cholerae* O1 et *V. cholerae* O139

En option : *V. cholerae* O1 Inaba et *V. cholerae* O1 Ogawa

Contrôles négatif *V. cholerae* non-O1, non-O139

Exécution des travaux :

1. Cultiver une colonie à partir d'une plaque de TCBS sur une plaque non sélective, par exemple TSA ou gélose au sang.
2. Incuber à +35 ... +37 °C pendant la nuit.
3. Déposer une goutte de sérum du groupe O1 sur la lame de verre.
4. À l'aide de cure-dents, suspendre la masse bactérienne de la plaque en une goutte sur la lame de verre.
5. Tourner la lame de verre avec précaution pour mélanger ; l'agglutination est visible à l'œil nu dans un délai de 30 s à 1 min.
6. Noter le résultat de la réaction (+++ pour une précipitation claire ; - pour aucune précipitation ; + ou ++ peuvent être utilisés si le résultat n'est pas clair et que le test doit être répété).
7. Si la souche ne s'agglutine pas avec le sérum du groupe O1, tester la souche avec l'antisérum O139.
8. Si la souche s'agglutine avec tous les antisérums, confirmer avec 0,9 % et 4 % de NaCl qu'il ne s'agit pas de la forme rugueuse (R), qui n'a pas du tout d'antigène O.
7. Éliminer les déchets conformément aux directives relatives à la gestion des déchets.

Interprétation des résultats :

Une réaction rapide et forte est un résultat positif et indique le sérotype de la souche (O1 ou O139). Si aucune réaction n'est observée, le résultat est négatif (non-O1/non-O139).

Calcul et communication des résultats

Si plusieurs volumes d'échantillon ont été analysés, les résultats sont calculés et enregistrés en tant que moyenne pondérée par volume conformément à la norme ISO 8199. Le résultat final pour l'eau du robinet, l'eau de puits et l'eau de surface est exprimé en unités formant colonie (UFC)/100 ml et pour les eaux usées en UFC/ml.

Les isolats identifiés comme étant des *Vibrio cholerae* toxigènes (par test PCR *ctxA* positif) ou des *Vibrio cholerae* O1 et O139 (par test de sérogroupage) sont en outre caractérisés par WGS.

4.3 Détection et isolement sélectif de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhi, c'est-à-dire *Salmonella* Typhi

Description de la méthode d'isolement sélectif de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. est analysée conformément à la norme ISO 19250 (ISO 19250:2010 Qualité de l'eau - Détection de *Salmonella* spp.). Toutefois, des modifications locales et/ou techniques sont nécessaires. En Finlande, par exemple, le MSR/V semi-solide est utilisé à la place du bouillon d'enrichissement de RVS. Les étapes de l'analyse de *Salmonella* sont décrites dans l'organigramme (Figure 6).

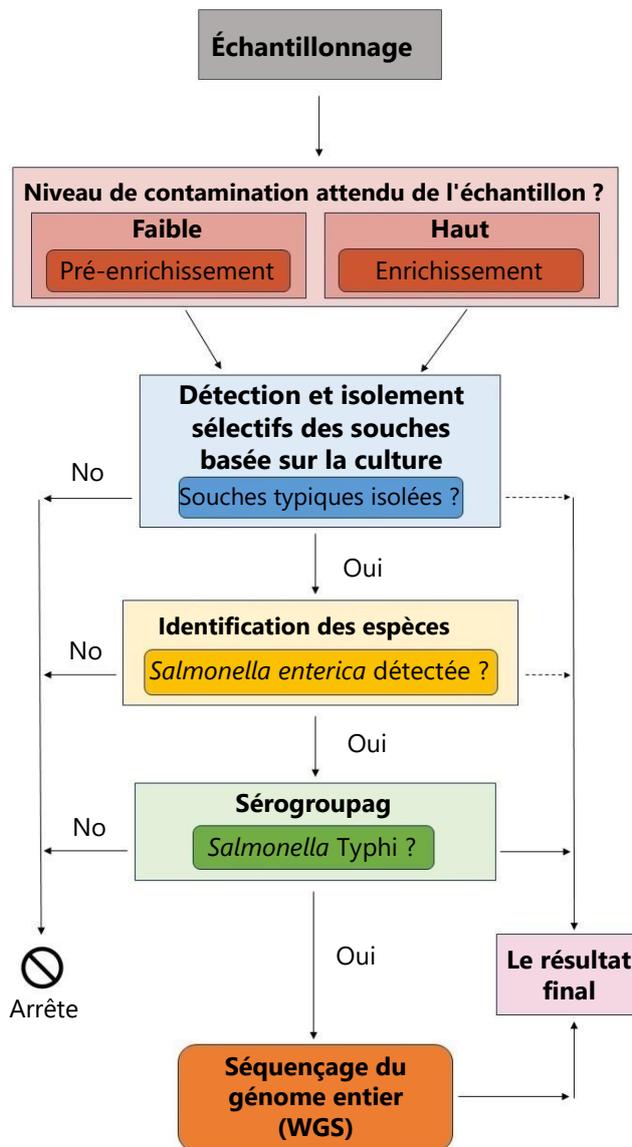


Figure 6. Les étapes de la détection et de l'isolement sélectif de *Salmonella enterica subsp. enterica* sérotype Typhi

Le contrôle de la qualité des réactifs et des matériaux doit être effectué conformément à la norme ISO 11133 (ISO 11133:2014 Microbiologie des aliments, de la nourriture pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture). La norme ISO 7704 définit des procédures d'assurance qualité pour les filtres à membrane (ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture).

Réactifs, matériaux et équipement

- Membrane filtrante
- Équipement de filtration sur membrane
- Pré-enrichissement :

- Eau peptonée tamponnée (BPW) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Enrichissement sélectif (des alternatives sont proposées et ont des performances variables)
 - Rappaport-vassiliadis semi-solide modifié (MSRV) (par exemple Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
 - Bouillon de Müller-Kauffmann au tétrathionate-novobiocine (MKTTn) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
 - Bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Isolement sélectif
 - Par exemple, milieu gélosé Xylose-Lysine-Désoxycholate (XLD) (par exemple, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni).
- Milieu gélosé non sélectif solide pour la culture pure, par exemple milieu gélosé Tryptone-Soja (TSA) (par exemple Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Diluant selon ISO 8199
- Incubateur
-

Protocole avec pré-enrichissement (pour les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux de surface)

En utilisant la technique de filtration sur membrane, filtrer l'échantillon d'eau à travers une membrane filtrante (Figure 1, Tableau 1). Après filtration, transférer la membrane filtrante dans de l'eau peptonée tamponnée (BPW). Incuber la BPW avec la membrane filtrante à (36 ± 2) °C pendant (18 ± 2) heures.

Après le pré-enrichissement, transférer 100 µl de bouillon BPW en trois gouttes sur une plaque MSRV semi-solide. Incuber la plaque MSRV à $(41,5)$ °C (24 ± 3) heures.

Il est également possible d'enrichir le bouillon RVS au lieu du milieu MSRV. Après le pré-enrichissement de la BPW, ajouter chaque bouillon de BPW au bouillon RVS et incuber à $(41,5\pm 1)$ °C pendant (24 ± 3) heures. L'enrichissement peut également être effectué avec le bouillon MKTTn. Après le pré-enrichissement de BPW, ajouter chaque bouillon de BPW au bouillon MKTTn et incuber à (36 ± 2) °C pendant (24 ± 3) heures.

Après incubation, vérifier la mobilité des bactéries sur la plaque MSRV. Transférer le matériel de la croissance mobile typique sur une plaque à la gélose XLD solide. Si un bouillon RVS ou MKTTn a été utilisé, transférer une anse de bouillon sur une plaque solide sélective (par exemple XLD).

Incuber la plaque à la gélose solide sélective à (36 ± 2) °C pendant (24 ± 3) heures et inspecter les plaques pour vérifier la présence d'une croissance typique conformément aux instructions du fabricant du milieu.

Réaliser des cultures pures à partir de colonies typiques de *Salmonella* spp. sur des plaques non sélectives, par exemple TSA, et incuber les plaques à (36 ± 2) °C pendant environ 24 heures en vue d'une confirmation ultérieure.

Protocole sans pré-enrichissement (pour les eaux usées)

En utilisant la technique de filtration sur membrane, filtrer l'échantillon d'eaux usées et transférer la membrane filtrante dans le bouillon RVS ou le bouillon MKTTn. Incuber le bouillon RVS à $(41,5 \pm 1)$ °C pendant (24 ± 3) heures et le bouillon MKTTn à (36 ± 2) °C pendant (24 ± 3) heures.

Après enrichissement, transférer le bouillon RVS ou le bouillon MKTTn sur la plaque XLD. Incuber la plaque XLD à (36 ± 2) °C (24 ± 3) heures et vérifier la croissance typique des plaques conformément aux instructions du fabricant du milieu.

Réaliser des cultures pures à partir de colonies typiques de *Salmonella* spp. sur des plaques non sélectives, par exemple TSA, et incuber les plaques à (36 ± 2) °C pendant environ 24 heures en vue d'une confirmation ultérieure.

Méthodes d'identification des souches de *Salmonella* spp.

Les colonies de *Salmonella* spp. peuvent être identifiées à l'aide de la méthode Maldi-ToF. La méthode Maldi-ToF est une méthode efficace et fiable pour la spéciation des souches de *Salmonella* spp. Lorsque la méthode Maldi-ToF n'est pas disponible, des tests biochimiques, comme API 20E (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) ou VITEK 2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) peuvent être utilisés pour la spéciation des souches de *Salmonella* spp.

Après avoir vérifié que l'espèce est bien *Salmonella enterica*, il faut procéder à une caractérisation plus poussée de l'isolat pour identifier le sérotype *Salmonella* Typhi.

Sérogroupage pour identifier le sérogroupage de *Salmonella* Typhi

Objectif du test : Vérifier si la *Salmonella enterica* isolée est de sérotype *Salmonella* Typhi.

Principe : la structure antigénique de *Salmonella* est réalisée par agglutination sur lame avec des antisérums de lapin.

Les sérotypes O et H de la souche de *Salmonella* sont déterminés. L'antigène O somatique est une partie du lipopolysaccharide (LPS) à la surface de la cellule bactérienne, qui se compose de chaînes de sucre. Si les chaînes de sucre sont complètes, la souche est de forme lisse (S) normale. Si les chaînes de sucre sont partiellement ou totalement absentes, la souche est de forme rugueuse (R). Les *Salmonella* sont capables de se déplacer activement à l'aide de leurs cils ou flagelles. Les antigènes H flagellaires sont situés à la surface des cils des bactéries. La plupart des *Salmonella* sont capables de former deux types de cils (phases H1 et H2). La présence des antigènes O et H est confirmée par agglutination antigène-anticorps sur des lames de verre, à l'aide d'antisérums de groupe, polyvalents et absorbés, commerciaux ou fabriqués sur place.

La structure antigénique du sérotype *Salmonella* Typhi est 9, Vi:d:-. D'autres sérotypes de *Salmonella* ont des structures antigéniques uniques.

Procédures de sécurité : les cultures vivantes de *S. Typhi* doivent être manipulées dans une enceinte de biosécurité si possible. Dans le cas contraire, il faut utiliser des EPI.

Échantillon : Culture pure fraîche sur une plaque.

Contrôles : Contrôle positif : *S. Typhi*

Contrôle(s) négatif(s) : certains autres sérotypes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* qui ne s'agglutinent pas avec les mêmes antisérums que *S. Typhi*.

Réactifs :

antisérums spécifiques pour la détection de la structure antigénique de *S. Typhi* :

- OMA : groupe O (1,2,3,4,5,9,10,12,15,19,21,46) Antisérum de lapin (Staten Serum Institute, SSI)
- O:9 : antisérum de lapin (SSI) du groupe O
- Vi : antisérum de lapin (SSI) du groupe O
- H:d : antisérum de lapin (SSI) en phase H
- Contrôles négatif : quelques autres antisérums O et H

Plaque à la gélose Swarm

Plaque à la gélose de Drigalski

Lames de verre

Cure-dents

Lampe (de table) à l'intérieur d'une enceinte de biosécurité ou sur une table de laboratoire

Exécution des travaux :

1. Cultiver une colonie d'aspect lisse sur une plaque Swarm (sérogroupe H) en traçant délicatement une courte ligne au centre de la plaque avec un bâtonnet de culture et utiliser le même bâtonnet pour faire une culture de dispersion sur une plaque de Drigalski (sérogroupe O). *S. Typhi* ne se déplace pas et la croissance sur la plaque Swarm ne doit pas se propager.

2. Incuber les plaques à +35...+37 °C pendant la nuit.

3. Sérogroupe O : Déposer une goutte de sérum du groupe O sur la lame de verre. À l'aide d'un cure-dent, suspendre la masse bactérienne de la plaque de Drigalski en une goutte sur la lame de verre. Tourner la lame de verre avec précaution pour mélanger pendant 1 minute. Il est possible de tenir la lame devant une lampe pour voir clairement la réaction. Une réaction positive peut apparaître en quelques secondes. Noter le résultat de la réaction (+++ pour une précipitation claire ; - pour aucune précipitation). Répéter avec les sérums O:9 et Vi et les sérums de contrôle négatif (par exemple O46). Au besoin, jusqu'à trois gouttes d'antisérums différents peuvent être déposées sur la même lame de verre, par exemple O:9, O:46 et Vi.

4. Sérogroupe H : déposer le sérum en phase H:d sur la plaque de verre. À l'aide d'un cure-dent, suspendre la masse bactérienne de la croissance sur la plaque Swarm. Tourner la lame de verre avec précaution pour mélanger pendant 1 minute. Une réaction positive peut apparaître en quelques secondes. Noter le résultat de la réaction (+++ pour une précipitation claire ; - pour aucune précipitation). Répéter l'opération avec des sérums de contrôle négatif.

Calcul et communication des résultats

Les résultats sont rapportés en tant que présence/absence dans le volume d'échantillon analysé. Dans le cas où plusieurs volumes d'échantillon ont été analysés, il est possible de fournir une estimation semi-quantitative du nombre.

Les isolats identifiés comme étant de sérotype *Salmonella* Typhi sont en outre caractérisés par WGS.

4.4 Détection, dénombrement et isolement des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) et de carbapénémases (EPC), *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*

Les méthodes basées sur la culture avec des géloses chromogènes sont utilisées pour détecter les BLSE et les EPC chez *E. coli* et *K. pneumoniae* (Heljanko et al. 2024, Tiwari et al. 2024).

Le contrôle de la qualité des réactifs et des matériaux doit être effectué conformément à la norme ISO 11133 (ISO 11133:2014 Microbiologie des aliments, de la nourriture pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture). La norme ISO 7704 définit des procédures d'assurance qualité pour les membranes filtrantes (ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture).

Réactifs, matériel et équipement

- Membrane filtrante
- Équipement de filtration sur membrane
- BLSE : CHROMagar Orientation + CHROMagar BLSE -supplément (par exemple CHROMagar, Paris, France)
- EPC : CHROMagar mSuperCARBA (par exemple CHROMagar, Paris, France)
- Milieu gélosé solide non sélectif pour la culture pure, par exemple la gélose tryptone soja (TSA), par exemple Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Royaume-Uni)
- Diluant, par exemple tampon de phosphate
- Incubateur

Protocole

En utilisant la technique de filtration sur membrane, filtrer l'échantillon d'eau à travers une membrane filtrante (Figure 1, Tableau 1). Après filtration, placer la membrane filtrante sur les plaques de milieu gélosé solide (CHROMagar Orientation + CHROMagar BLSE -supplément et CHROMagar mSuperCARBA) et incubé les plaques à (36 ± 2) °C pendant 18-24 heures.

Pour les eaux usées, préparer des séries de dilution en utilisant, par exemple, un tampon de phosphate comme diluant. Pipeter l'échantillon d'eaux usées et/ou ses dilutions au 1:10 sur des plaques de milieu gélosé solide (CHROMagar Orientation + CHROMagar BLSE -supplément et CHROMagar mSuperCARBA) et répandre l'inoculant. La dilution de l'échantillon et l'ensemencement sur un milieu de culture sont effectués conformément à la norme ISO 8199. Incuber les plaques à (36 ± 2) °C pendant 18-24 heures.

Après incubation, dénombrer les colonies typiques sur chaque plaque chromogène selon les indications du fabricant du milieu de culture.

Réaliser des cultures pures à partir de colonies typiques sur des plaques non sélectives, par exemple TSA, et incubé les plaques à (36 ± 2) °C pendant environ 24 heures pour une autre confirmation.

Identification des espèces d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* (BLSE/EPC)

L'identification des espèces d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* porteurs de BLSE et d'EPC peut être réalisée à l'aide de la technique Maldi-ToF. La méthode Maldi-ToF est une méthode efficace et fiable pour la spéciation des souches d'entérobactéries. Lorsque la méthode Maldi-ToF n'est pas disponible, des tests biochimiques comme API 20E (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) ou VITEK 2 (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) peuvent être utilisés pour l'identification des espèces.

Calcul et communication des résultats

Si plusieurs volumes d'échantillon ont été analysés, les résultats sont calculés et enregistrés en tant que moyenne pondérée par volume conformément à la norme ISO 8199. Le résultat final pour l'eau du robinet, l'eau de puits et l'eau de surface est exprimé en unités formant colonie (UFC)/100 ml et pour les eaux usées en UFC/ml

Les isolats identifiés comme étant *E. coli* et *K. pneumoniae* sont en outre caractérisés par WGS.

5. Séquençage du génome entier d'isolats bactériens

Le matériel de laboratoire et les réactifs pour le séquençage du génome entier bactérien ont été répertoriés dans l'Annexe B du manuel ODIN Laboratory reagents and equipment for bacterial WGS (Réactifs et équipements de laboratoire pour le WGS bactérien).

5.1 Extraction d'ADN à partir d'isolats bactériens

Il existe plusieurs options pour effectuer une extraction d'ADN. Deux kits, MagAttract et QIAmp DNA mini kit, sont décrits ici.

Protocole avec le kit MagAttract

L'extraction d'ADN avec le kit d'extraction commercial MagAttract (Qiagen) est basée sur un protocole simple utilisant des billes magnétiques. La méthode peut être utilisée pour purifier l'ADN entre 100 et 200 kilobases. La méthode d'isolement est très sélective et minimise les contraintes de cisaillement de l'ADN, ce qui permet de produire une longue chaîne d'ADN. L'ADN isolé est très pur et peut être utilisé directement pour les réactions de séquençage de la prochaine génération ou pour le génotypage.

La méthode d'isolement comprend quatre étapes : la lyse, la fixation de l'ADN sur des billes magnétiques, le lavage et l'éluion. Chez les différentes espèces bactériennes, l'étape initiale de l'extraction, c'est-à-dire la destruction de la bactérie et la décomposition des cellules, peut être réalisée de différentes manières. Les tampons et les enzymes optimisés lysent délicatement les échantillons tout en garantissant une fragmentation minimale de l'ADN génomique. Ensuite, l'ADN se lie à la surface des billes magnétiques et l'échantillon est lavé pour se débarrasser des contaminants et des inhibiteurs de la PCR. Pour finir, l'ADN pur est élué dans un tampon où il peut être conservé à l'état congelé.

Échantillon

La souche bactérienne utilisée est une culture pure fraîche sur une plaque non sélective appropriée.

Réactifs pour l'extraction

Kit ADN HMW MagAttract (fabricant Qiagen, Allemagne, numéro de produit 67563), à conserver à température ambiante pendant un an après ouverture.

Contenu du kit :

Tampon ATL
Tampon AL
Tampon MB
Tampon MW1
Tampon PE
Tampon AE
Protéinase K
RNase A (100 mg/ml)
Eau exempte de nucléase

Éthanol, 95 à 99 %.

Lysostaphine (1 mg/ml), SIGMA, Lysostaphine de Staphylococcus staphylolyticus, Réf. L7386-15MG, conservation à -20 °C.

Lysozyme (100 mg/ml), conservation -20 °C

Mutanolysine (1 mg/ml), SIGMA, Mutanolysine de Streptomyces globisporus ATCC 21553, Réf. M9901-10KU, conservation à -20 °C

Tampon P1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0), conservation à température ambiante

Tampon TE (1 M Tris-HCl, 0,5 M EDTA pH 8,0), conservation à température ambiante

EDTA, 0,1 mM+Tris-HCl, 10 mM (tampon Low-TE), pH 8,0 Stérile, conservation à température ambiante

Réactifs de mesure Qubit

Réactifs du kit d'essai ADNdb BR Qubit (Invitrogen) : ThermoFisher SKU Q32850

- Réactif ADNdb BR Qubit, à conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Tampon ADNdb BR Qubit, conservation à température ambiante
- ADNdb BR Qubit standard 1#, conservation au réfrigérateur (+2 - +8 °C)
- ADNdb BR Qubit standard 2#, conservation au réfrigérateur (+2 - +8 °C)

Réactifs pour électrophorèse sur gel d'agarose

Par exemple SeaKem LE Agarose (Lonza Rockland, ME USA, art. n°50005) peut être utilisé, conservation à température ambiante.

Tampon 5×TBE (Tris-Borate-EDTA)

- préparer une solution de travail de 0,5×TBE en diluant 1:10 dans de l'eau purifiée
- conservation à température ambiante

Eau milliQ purifiée, non stérile, conservation à température ambiante

Marqueur de masse moléculaire : échelle d'extension d'ADN 1 kb (par exemple, Invitrogen, numéro de produit 10511-012 ; les brins marqueurs sont exprimés en paires de bases (pb) : 517/506, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090/5000, 6108, 8144, 10 000 et 40 000). Conservation au congélateur (en dessous de -18 °C)

Colorant de charge d'ADN 6x (par exemple Thermo Scientific N° de pièce R0611 (colorant de charge d'ADN 6x fourni avec GeneRuler Échelle d'ADN 100 pb), à conserver au congélateur (en dessous de -18 °C).

SYBR Safe 10 000 X (S33102, Invitrogen)

- Conservation à température ambiante et à l'abri de la lumière
- Expiration 6 mois après ouverture du tube de réactif
- Solution de travail 1X (diluée dans le tampon TBE) conservation au réfrigérateur (+2...+8 °C) - la solution de travail reste bonne pendant une semaine

Équipement

- Vortex
- Bloc chauffant/bain chauffant +100 °C
- Agitateur thermique (Thermomixer)
- Balance
- Micro-ondes
- Centrifugeuse
- Système d'analyse de gel d'agarose (boîte de gel et alimentation)
- Système d'imagerie pour gel UV
- Réfrigérateur +2...+8 °C
- Congélateur au-dessous de -18 °C
- Enceinte à flux laminaire
- Fluorimètre Qubit 2.0

Consommables

- Tubes stériles de 2 ml en plastique Eppendorf SafeSeal
- Tubes Eppendorf stériles en plastique de 1,5 ml avec bouchons à vis Tubes Eppendorf stériles en plastique de 1,5 ml
- Tubes Eppendorf stériles de 0,5 ml en plastique : tubes d'essai Qubit (jeu de 500, réf. Q32856, Life technologies) ou tubes Axygen PCR-05-C (VWR, n° de pièce 10011- 830)
- Tubes en plastique de 2 ml contenant des billes céramique Lysing Matrix D. (MP Biomedicals, réf. fab. : 6913050)
- Porte-tubes
- Pipettes
- Gants jetables (gants en nitrile pour la manipulation de l'EtBr)

- Embouts de pipette filtrés
- Support magnétique
- Flacon Erlenmeyer, par exemple 250 ml

Installations de travail

Le travail est effectué dans la salle d'extraction d'ADN.

Protocole

L'extraction d'ADN se fait toujours à partir d'une culture bactérienne pure et fraîche. S'assurer que la culture bactérienne a été réalisée dans des conditions optimales (température et atmosphère) sur un milieu non sélectif adapté à l'espèce. Il faut toujours s'assurer que les bactéries à extraire pour l'ADN poussent proprement et qu'il n'y a pas de contamination sur la plaque.

- Cultiver les *E. coli* et *K. pneumoniae* BLSE/EPC sur une plaque MH II et incuber à +35-37 °C pendant la nuit.
- Cultiver des *Vibrio cholerae* et des *Salmonella* Typhi sur la plaque R1 et incuber à +35-37 °C ; si nécessaire, elles peuvent également être cultivées sur une plaque de gélose au sang.

Extraction d'ADN

Première étape de l'extraction d'ADN : ESBL/CPE *E. coli* et *K. pneumoniae* et *Salmonella* Typhi (gram négatif)

Préchauffer le bloc de chauffe ou le bain-marie à l'avance.

Pipeter 180 µl de tampon ATL dans des microtubes SafeSeal de 2 ml, prélever la masse bactérienne de la plaque à l'aide d'un bâtonnet d'inoculation, puis la dissoudre doucement dans le tampon en agitant le vortex par impulsions. REMARQUE ! Le travail doit être effectué dans une enceinte de biosécurité.

Utiliser un bouchon verrouillable sur les tubes Eppendorf.

Chauffer les tubes à +100 °C sur un bloc de chauffe ou dans un bain-marie pendant 10 minutes.

Laisser refroidir avant de passer à l'étape suivante. Centrifuger brièvement.

Continuer à isoler l'ADN.

Première étape de l'extraction d'ADN : *Vibrio cholerae* (gram négatif)

1. Pipeter 300 µl de tampon TE dans un microtube SafeSeal de 2 ml et prélever la masse bactérienne de la plaque à l'aide d'un bâtonnet d'inoculation ou d'une petite anse. Centrifuger pendant 2 minutes à 13 000 x g et éliminer le surnageant.
2. Dissoudre le culot bactérien (remettre en suspension) dans 180 µl de tampon ATL.
3. Passer à l'extraction d'ADN.

Extraction d'ADN

Vérifier que les tampons MW1 et PE du kit d'extraction d'ADN ont été dissous dans l'éthanol. En cas d'ouverture d'un nouveau kit, documenter les informations nécessaires dans le dossier de suivi des réactifs.

1. Chauffer l'agitateur thermique à + 56 °C.

2. Ajouter 20 µl de protéinase K et mélanger en tapotant le tube.
3. Incuber à +56 °C pendant 30 minutes (900 tours/minute). Centrifuger brièvement.
4. Ajouter 4 µl de RNase A (100 mg/ml), mélanger par vortex pulsé (ou tapoter le tube plusieurs fois) et incuber pendant 2 à 15 min à température ambiante (15 à 25 °C). Remarque : le refroidissement de l'agitateur thermique de 56 °C à > 23 °C prend environ 15 minutes.
5. Ajouter à l'échantillon 15 µl de suspension MagAttract G (passer au vortex avant utilisation) et 280 µl de tampon MB. Mélanger à l'aide d'un vortex à pulsations. Placer les tubes avec l'échantillon dans le porte-tubes.
6. Placer les tubes et le support de tubes sur le mélangeur thermique et incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 3 minutes à 1 400 tours/minute.
7. Placer le porte-tube sur le support magnétique, attendre (~ 1 min) jusqu'à ce que la séparation des billes soit complète et retirer le surnageant (retirer environ 500 à 800 µl). Éviter de toucher les billes magnétiques lors de l'élimination du surnageant.
8. Retirer les tubes du support magnétique et ajouter 700 µl de tampon MW dans les tubes, puis placer les tubes dans l'agitateur thermique. Incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 min à 1 400 tours/minute.
9. Répéter les étapes 7 et 8, effectuer à nouveau l'étape 7.
10. Retirer les tubes du support magnétique et ajouter 700 µl de tampon PE dans les tubes, puis placer les tubes dans l'agitateur thermique. Incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 min à 1 400 tours/minute.
11. Répéter les étapes 7 et 10, effectuer à nouveau l'étape 7, puis éliminer soigneusement toute trace de tampon PE à l'aide d'une petite pipette.
12. Ne pas retirer les tubes du support magnétique. Rincer les particules avec 700 µl d'eau sans nucléase pendant que les billes sont attachées à la paroi du tube d'échantillon. Incuber pendant 1 minute à température ambiante (15 à 25 °C) sur un support magnétique, puis éliminer le surnageant. IMPORTANT : ne pas pipeter l'eau directement dans le culot de billes, mais la pipeter contre la paroi opposée au culot de billes du tube d'échantillonnage.
13. Répéter l'étape 12.
14. Retirer les tubes du support magnétique et ajouter un volume approprié de tampon AE, 100 à 200 µl, généralement 150 µl. Placer les tubes d'échantillon dans l'agitateur thermique et incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 3 min à 1 400 tours/minute.
15. Transférer les tubes sur le support magnétique, attendre (~ 1 min) que les billes magnétiques se soient séparées. Transférer le surnageant contenant l'ADN dans un nouveau tube d'échantillon propre. Inscrire la date et le nom de la personne qui a effectué l'extraction sur les tubes. Conserver l'ADN extrait à -20 °C.

Détermination de la concentration d'ADN avec Qubit

Tous les réactifs doivent être à température ambiante (15 à 25 °C) avant utilisation. Ne pas tenir les réactifs ou les tubes trop longtemps dans les mains pour éviter qu'ils ne se réchauffent (une augmentation de la température peut affecter le résultat). Lors de l'activation de nouveaux réactifs, documenter les informations requises pour la surveillance des réactifs.

1. Compter le nombre de tubes Qubit (0,5 ml) nécessaires.
2. Diluer la quantité nécessaire de solution de travail Qubit :

Le réactif ADNdb BR Qubit est dilué à 1:200 dans le tampon ADNdb BR Qubit. Calculer 199 µl de tampon et 1 µl de réactif par échantillon. Le tampon moussant facilement, il peut être nécessaire de calculer une marge de pipetage pour un échantillon supplémentaire. Les normes sont mesurées à chaque fois.

3. Pipeter la solution de travail dans les tubes :

Étalon : 190 µl de solution de travail + 10 µl de solution étalon

Échantillon : 195 µl de solution de travail + 5 µl d'ADN extrait

(il est également possible d'utiliser 180 à 199 µl de solution de travail + 1 à 20 µl d'ADN isolé)

4. Passer les tubes au vortex pendant 2 à 3 secondes et incuber à température ambiante pendant 2 minutes.

5. Mesure d'un échantillon avec un lecteur Qubit :

Toucher l'écran pour ouvrir l'instrument Qubit.

Sélectionner DNA (ADN)-> sélectionner dsDNA Broad range (ADNdb (gamme large))

Sélectionnez pour lire de nouveaux étalonnages, c'est-à-dire les échantillons-types. Si c'est le cas, sélectionner Yes (Oui) et insérer le premier tube étalon dans la machine, puis sélectionner Read (Lire). Supprimer étalon 1# et lire étalon 2#. Si la lecture des étalons n'est pas souhaitée, sélectionner No (Non).

Sélectionner Read/Read Next Sample (Lire/Lire l'échantillon suivant) pour lire les échantillons. La valeur qui apparaît sur l'écran indique la concentration en ADN du tube. Appuyer sur Calculate Stock Conc. (Calculer la concentration de la solution de réserve) pour connaître la teneur en ADN de l'échantillon. Sélectionner la quantité d'ADN pipetée (généralement 5 µl) et l'unité ng/l pour connaître la teneur en ADN de l'échantillon.

6. Enregistrer les résultats, par exemple dans un cahier de laboratoire (électronique) ou une feuille de calcul Excel.

7. Après avoir enregistré le résultat, sélectionner Read Next Sample (Lire l'échantillon suivant) et lire l'échantillon suivant.

Une concentration d'ADN supérieure à 1 ng/µl est considérée comme bonne. Si la concentration est inférieure, l'extraction d'ADN sera renouvelée. Les concentrations sont prises en compte pour la dilution de l'ADN en vue de la constitution de la bibliothèque.

Vérification de la qualité de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

En cas de problèmes et lors de l'extraction d'ADN d'une nouvelle espèce bactérienne, un échantillon d'ADN extrait est prélevé et analysé sur un gel d'agarose à 1,0 % (1,0 g de SeaKem LE/100 ml de tampon TBE 0,5x). L'étalon de masse moléculaire utilisé est une échelle d'extension d'ADN 1 kb (fragments de 500 à 40 000 pb), qui sert pour une largeur de puits de gel d'environ 0,1 g/1 mm. (L'ADN de haut poids moléculaire a une taille supérieure à 50 kb et présente un maculage minimal). L'échantillon pour l'analyse du gel est préparé comme suit :

ADN extrait	5 µl
Colorant de charge d'ADN 6x	1 µl

L'étalon de masse moléculaire est préparé comme suit :

Échelle d'extension d'ADN 1 kb	2 μ l
Eau PCR	3 μ l
Colorant de charge d'ADN 6x	1 μ l

Pipeter la totalité de l'échantillon (6 μ l) dans le puits du gel. Pipeter 3 μ l de l'étalon de masse moléculaire aux deux extrémités du gel.

Analyser les échantillons dans le gel à 80 V, 120 min.

Colorer le gel avec la solution de coloration pour acides nucléiques Sybr Safe ou RefSafe™. Image avec l'Alphamager.

Exemple de protocole : Coloration avec le colorant Sybr Safe

- Pour préparer la solution de coloration, diluer le réactif Sybr Safe 10 000x à une concentration 1x en utilisant le tampon TBE 0,5x (solution de coloration). Préparer une quantité suffisante de la solution de coloration 1x pour immerger complètement le gel. Par exemple, 10 μ l de Sybr Safe 10 000x pour 100 ml de tampon TBE 0,5x.
- Protocole de coloration : immerger le gel dans la solution de coloration et incubé pendant 30 minutes. Si possible, agiter le gel sur un agitateur orbital à 50 tours/minute ou secouer doucement le plateau de coloration du gel plusieurs fois pendant la période d'incubation. Après incubation, le gel est prêt pour l'imagerie.
- Les gels colorés avec Sybr Safe peuvent être éliminés comme des déchets normaux.

La taille et la qualité de l'échantillon sont évaluées visuellement à partir de l'image du gel. Si le fragment est très peu visible ou pas du tout, ou si de l'ARN (bandes supplémentaires) ou de l'ADN fragmenté (voile) est visible sur l'image, l'ADN est à nouveau extrait. La Figure 7 montre un exemple d'ADN de mauvaise qualité et de bonne qualité sur le gel. La Figure 7a) montre des zones supplémentaires et beaucoup de maculage. Dans la Figure 7b), les zones d'ADN sont claires et ont une taille d'environ 40 kb.

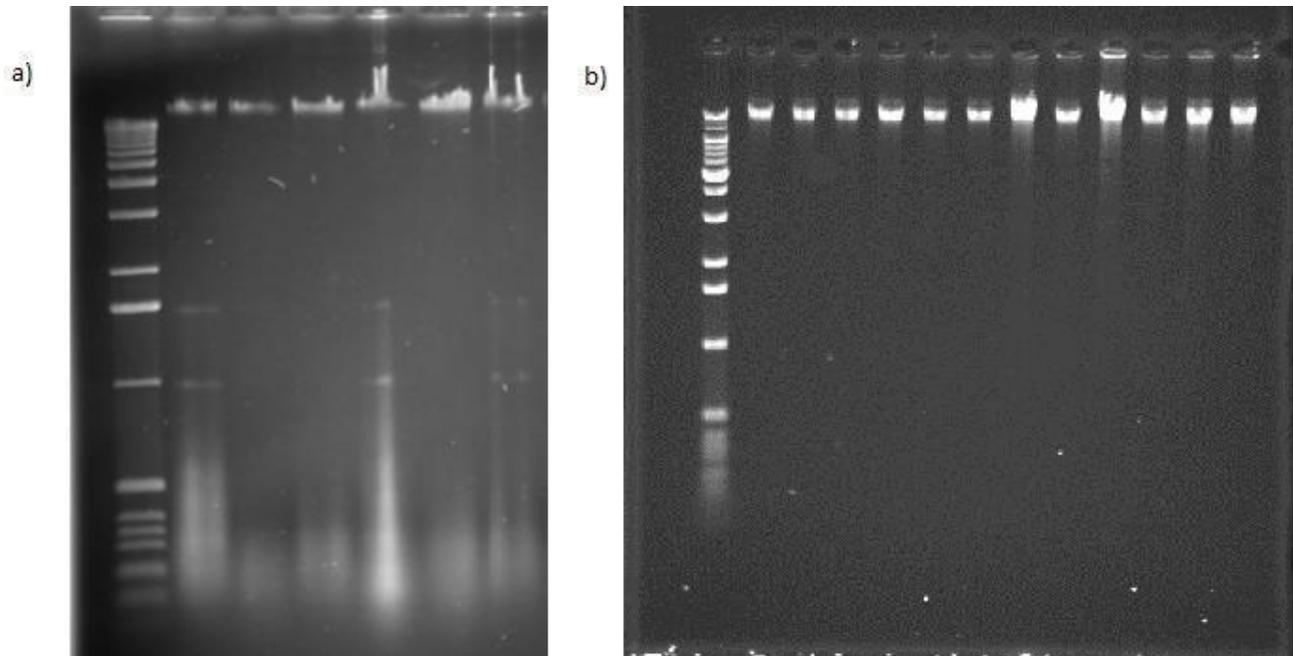


Figure 7. Échantillons d'ADN de mauvaise qualité (a) et de bonne qualité (b) passés sur un gel.

Protocole avec le mini kit QIAamp DNA

Notes avant de commencer

- Si un précipité s'est formé dans le tampon ATL ou le tampon AL, le dissoudre en l'incubant à 56 °C.
 - Ajouter de l'éthanol aux concentrés de tampon AW1 et tampon AW2, comme indiqué sur le flacon. Équilibrer les échantillons à la température ambiante (15 à 25 °C).
1. Cultiver les bactéries et effectuer les premières étapes de l'extraction d'ADN comme décrit dans le chapitre *Protocole avec le kit MagAttact*.
 2. Ajouter 180 µl de tampon ATL dans un tube Eppendorf (tube stérile de 1,5 ml sans ADN).
 3. Prélever (2 à 5) colonies de bactéries d'une culture fraîche (pendant la nuit) et les mélanger dans un tube contenant le tampon ATL.
 4. Passer au vortex pendant quelques secondes.
 5. Ajouter la protéinase K (20 µl), mélanger au vortex, puis incuber à 56 °C pendant 2 heures.
 6. Ajouter 200 µL de tampon AL à l'échantillon, mélanger au vortex pendant 15 s, puis incuber à 70 °C pendant 10 minutes. Après le mélange, centrifuger brièvement le tube de microcentrifugation de 1,5 ml pour éliminer les gouttes de l'intérieur du couvercle.
 7. Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) à l'échantillon et mélanger au vortex pendant 15 secondes. Après le mélange, centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml pour éliminer les gouttes à l'intérieur du couvercle.

8. Appliquer soigneusement le mélange de l'étape 7 (y compris le précipité) sur la mini colonne de centrifugation QIAamp (dans un tube de collecte propre de 2 ml) sans mouiller le bord. Fermer le bouchon et centrifuger à 6 000 x g (8 000 tours/minute) pendant 1 min. Placer la mini colonne de centrifugation QIAamp dans un tube collecteur propre de 2 ml et jeter le tube contenant le filtrat.
9. Ouvrir soigneusement la mini colonne de centrifugation QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW1 sans mouiller le bord. Fermer le bouchon et centrifuger à 6 000 x g (8 000 tours/minute) pendant 1 min. Placer la mini colonne de centrifugation QIAamp dans un tube de collecte propre de 2 ml (fourni) et jeter le tube de collecte contenant le filtrat.
10. Ouvrir soigneusement la mini colonne de centrifugation QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW2 sans mouiller le bord. Fermer le bouchon et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g ;14 000 tours/minute) pendant 3 min.
11. Recommandé : placer la mini colonne de centrifugation QIAamp dans un nouveau tube de collecte de 2 ml (non fourni) et jeter l'ancien tube de collecte avec le filtrat. Centrifuger à pleine vitesse (14 000 tours/minute) pendant 1 minute.
12. Placer la mini colonne de centrifugation QIAamp dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml (non fourni) et jeter l'ancien tube de collecte avec le filtrat. Ouvrir soigneusement la mini colonne de centrifugation QIAamp et ajouter 50 µl de tampon AE OU d'eau distillée. Incuber à température ambiante pendant 1 minute, puis centrifuger à 6 000 x g (8 000 tours/minute) pendant 1 minute.
13. Ajouter à nouveau 50 µl de tampon AE ou d'eau distillée à la mini colonne de centrifugation. Incuber à température ambiante pendant 1 minute, puis centrifuger à 6 000 x g (8 000 tours/minute) pendant 1 minute.
14. Déterminer la concentration d'ADN et vérifier la qualité comme décrit dans le chapitre *Protocole avec le kit MagAttract*.

5.2 Préparation de bibliothèques WGS avec le kit Illumina Nextera XT et séquençage avec l'instrument MiSeq

Le kit Illumina Nextera XT peut être utilisé afin de créer une bibliothèque pour le séquençage du génome entier. L'ADN de l'échantillon est marqué avec des amorces indexées spécifiques et amplifié par la PCR. À l'aide d'amorces indexées, les différents échantillons de la bibliothèque sont séparés les uns des autres après le séquençage. Le produit PCR généré est purifié et la quantité d'ADN est normalisée en mesurant la taille de la bibliothèque avec un instrument BioAnalyzer, puis en déterminant la concentration avec un instrument Qubit ou une méthode basée sur des particules magnétiques. Les particules magnétiques fixent une certaine quantité d'ADN, qui est finalement élué des particules magnétiques. Pour finir, tous les échantillons de la bibliothèque sont mis en pool et la bibliothèque mise en pool est dénaturée avant le séquençage. La réaction de séquençage est effectuée avec l'instrument MiSeq, et les résultats sont traités avec différents programmes d'analyse en fonction de l'espèce bactérienne.

Échantillon

ADN, extrait à l'aide du kit MagAttract ou du mini kit QIAamp DNA, et dont la concentration a été mesurée à l'aide du dispositif Qubit.

Réactifs

Les réactifs utilisés dans la méthode sont présentés à l'Annexe B Réactifs et équipement de laboratoire pour le WGS bactérien.

Équipement

Vortex
Machine PCR
Centrifugeuse à plaques (et adaptateur + contrepoids)
Centrifugeuse (et adaptateurs pour les tubes d'amorces indexées)
Mélangeur à plaque (chauffage)
Pipettes
Instrument MiSeq
Pipettes (électroniques)
Bloc de chauffe +100 °C
Support aimanté

Consommables

Plaques 24 puits
Feuille alu/feuilles adhésives
Tubes Eppendorf de 1,5 ml nettoyés en usine
Embouts de pipette avec filtres
Gants de protection
Tubes de 50 ml
Récipient gradué de 100 ml

Installations de travail

Le travail est effectué dans les installations de laboratoire PCR et d'extraction d'ADN. Certaines étapes du travail sont effectuées dans des installations pré-PCR et d'autres dans des installations post-PCR.

Protocole

Sécurité au travail

Certains des réactifs utilisés dans ce travail contiennent du formamide (réactifs LNA1 et LNW1 et cartouche de réactifs utilisée dans les analyses MiSeq). Le formamide est absorbé dans l'organisme par inhalation, par la peau et par ingestion. Le formamide peut irriter les yeux et la peau. Le formamide est classé comme un danger pour la reproduction et peut endommager le fœtus.

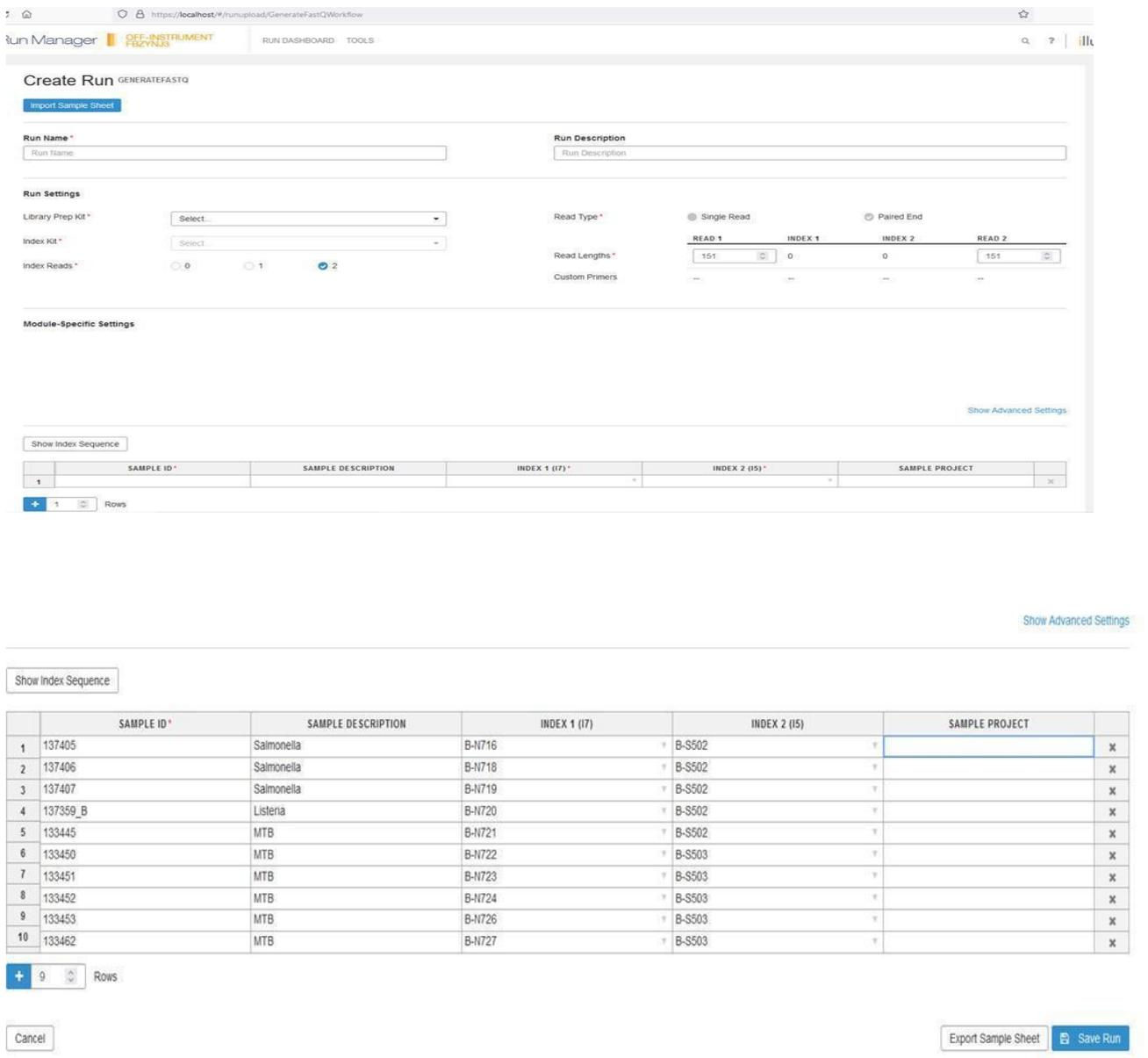
Porter toujours un manteau de protection et des gants en nitrile pendant le travail. Certaines étapes du travail sont effectuées sous une hotte.

Le flux de travail

Avant de commencer, concevoir les paires d'amorces indexées avec le programme Local Run Manager (le programme LRM doit être installé sur votre machine ou utiliser le programme sur l'appareil MiSeq).

Local Run Manager -> Create Run (Créer l'analyse) -> sélectionner GenerateFastQ -> Remplir les informations requises pour l'analyse (obligatoire marquée en rouge *) -> Nom de l'analyse date de l'analyse -> Kit de préparation pour la bibliothèque à partir du menu déroulant Nextera XT -> Index Kit

dans le menu déroulant l'Index Kit à utiliser (A ou B) ->autres paramètres comme dans l'image ci-dessous -> Dans la section **Lignes**, les lignes sont ajoutées à partir du signe + - ou en écrivant un nombre correspondant au nombre d'échantillons dans la bibliothèque -> **ID de l'échantillon** dans le numéro de souche -> **Description de l'échantillon** dans le nom de la bactérie (remarque ! ne pas utiliser d'espaces ou de caractères interdits comme : ? () [] / \ = + < > ; " ' , * ^ | & . dans aucune colonne), la section Projet d'échantillon peut être laissée vide -> enfin sélectionner **Exporter la feuille d'échantillon** -> Enregistrer le fichier csv sur le réseau du laboratoire dans un dossier approprié (ou alternativement sur une clé USB)



Create Run GENERATEFASTQ

Import Sample Sheet

Run Name *
Run Description

Run Settings

Library Prep Kit *
Index Kit *
Index Reads * 0 1 2

Read Type *
Single Read Paired End

Read Lengths *
Custom Primers

Module-Specific Settings

Show Index Sequence

	SAMPLE ID *	SAMPLE DESCRIPTION	INDEX 1 (I7) *	INDEX 2 (I5) *	SAMPLE PROJECT
1	137405	Salmonella	B-N716	B-S502	
2	137406	Salmonella	B-N718	B-S502	
3	137407	Salmonella	B-N719	B-S502	
4	137359_B	Listeria	B-N720	B-S502	
5	133445	MTB	B-N721	B-S502	
6	133450	MTB	B-N722	B-S503	
7	133451	MTB	B-N723	B-S503	
8	133452	MTB	B-N724	B-S503	
9	133453	MTB	B-N726	B-S503	
10	133462	MTB	B-N727	B-S503	

Export Sample Sheet Save Run

Il faut utiliser les index de manière uniforme ainsi que le fichier de suivi de la consommation. Il ne peut y avoir deux paires d'index identiques dans la même analyse. Le programme affichera une erreur si cela se

produit et demandera de modifier les paires d'index. Il est conseillé de prendre une copie d'écran du tableau d'index et de l'imprimer en vue de s'en servir comme guide pour le pipetage.

Remarque ! Index Kit V2 Les index A et B sont utilisés alternativement dans les analyses pour éviter l'effet « report » des indices.

Contrôles et modèle

Le succès de la préparation de la bibliothèque est vérifié à chaque analyse. Une analyse réussie de la souche indique que le séquençage de la souche a été effectué avec succès. En outre, le succès de la préparation de la bibliothèque est contrôlé par le séquençage de l'ADN génomique d'un isolat connu bien caractérisé, par exemple une souche ATCC d'une espèce appropriée, par exemple *E. coli*. Une bibliothèque est créée à partir de l'ADN de contrôle, elle est cultivée avec d'autres souches une fois par mois et analysée comme les autres souches de cette espèce. Ce contrôle est valable pour toutes les souches, et pas seulement pour les souches d'*E. coli*.

En plus du contrôle positif, un contrôle « échantillon zéro » est séquencé au moins 4 fois par an, c'est-à-dire un échantillon qui ne contient pas de matériel bactérien. L'échantillon zéro est fabriqué à partir de l'isolement de l'ADN (pas de bactéries, uniquement un tampon TE), comme le serait une « souche normale ». L'objectif du contrôle est d'examiner la quantité non ciblée (par exemple avec le programme Kraken2).

REMARQUE ! Les quantités de réactifs réduites de moitié sont principalement utilisées pour créer la bibliothèque, auquel cas il faut respecter les quantités de pipetage indiquées entre parenthèses dans les instructions. En cas de problèmes lors de la préparation de la bibliothèque (par exemple, un contenu en ADN trop faible avant la normalisation), il est également possible d'utiliser les quantités totales lors du renouvellement de la bibliothèque.

Diluer les échantillons d'ADN dans la salle d'extraction d'ADN à une concentration de 0,2 ng/μl (**0,4 ng/μl**) dans un tampon TE faible (ou de l'eau exempte de nucléase).

Tagmentation (fragmentation et ajout d'adaptateurs)

Aller dans la salle des modèles ou travailler sur le banc dédié à l'ajout de modèles. Travailler si possible dans une enceinte de biosécurité.

- Prendre le tampon TD et l'ATM pour les décongeler du congélateur.
- Retourner le tampon TD et ATM 3 à 5 fois pour mélanger. Ne pas passer au vortex.
- Prendre une plaque 24 puits et l'étiqueter avec la combinaison de lettres NTA (=Plaque Nextera Tagment Amplicon)
- Découper un morceau de film protecteur de la taille de la plaque.
- Ajouter à chaque puits utilisé (**coupé en deux**)

10 μl (**5 μl**) de tampon TD

5 μl (**2,5 μl**) d'échantillon d'ADN

5 μl (**2,5 μl**) d'ATM

- Fermer soigneusement le film protecteur, mélanger au vortex (environ 5 secondes) et centrifuger pendant environ une minute dans une centrifugeuse à plaques. S'assurer que la centrifugeuse est équipée d'un contrepoids et utiliser une plaque 96 puits comme adaptateur.
- Placer le disque dans l'instrument PCR et exécuter le programme suivant :

55 °C pendant 5 minutes

10 °C pour ∞

- Retirer la plaque de puits de l'instrument PCR dès que la température de l'échantillon a atteint 10 °C.
- Sortir les amorces indexées et le NPM du congélateur pour les décongeler.
- Remplacer le film protecteur et ajouter 5 µl (**2,5 µl**) de tampon NT (conservation à température ambiante) dans chaque puits.
- Sceller soigneusement avec une feuille d'aluminium, mélanger au vortex (environ 5 secondes) et centrifuger pendant une minute à l'aide d'une centrifugeuse à plaques.
- Laisser reposer à température ambiante pendant 5 minutes.

Index-PCR

- Décongeler le NPM et les amorces indexées bien avant cette étape.
- Retourner chaque tube (NPM et amorces) 3 à 5 fois et centrifuger les solutions jusqu'au fond. Utiliser des adaptateurs (tubes Eppendorf vides) pour la centrifugation.
- Ajouter à chaque puits d'échantillon
 - 15 µl (**7,5 µl**) de NPM
 - 5 µl (**2,5 µl**) d'amorce indexées 2 (capuchons blancs) dans chaque puits d'échantillon (n'ouvrir qu'un capuchon à la fois). Le remplacer chaque fois par un nouveau bouchon.
 - 5 µl (**2,5 µl**) d'amorces indexées 1 (capuchons orange) dans chaque puits d'échantillon (n'ouvrir qu'un capuchon à la fois). Le remplacer chaque fois par un nouveau bouchon.
- Prendre une nouvelle feuille de protection et la fermer soigneusement, mélanger avec un vortex (environ 5 secondes) et centrifuger pendant environ une minute dans une centrifugeuse à plaques.
- Apporter la plaque à la machine PCR et exécuter le programme suivant :
 - 72 °C pendant 3 minutes
 - 95 °C pendant 30 s
 - 12 cycles :

95 °C - 10 s

55 °C - 30 s

72 °C - 30 s

72 °C pendant 5 minutes

10 °C ∞
- S'il faut arrêter le travail à ce stade, il est possible de conserver la plaque au réfrigérateur pendant 1 à 2 jours.

Purification du produit PCR

- Poursuivre le travail dans l'enceinte de biosécurité de la salle post-PCR.
- Sortir à l'avance la suspension de billes AmPure XP du réfrigérateur et laisser à température ambiante (environ 15 à 30 minutes avant de commencer le travail).
- Sortir le RSB (tampon de resuspension) pour le décongeler.
- Préparer de l'éthanol à 80 % à partir d'alcool absolu. Diluer l'éthanol dans de l'eau exempte de nucléase. 360 µl (**400 µl**) d'éthanol sont nécessaires par échantillon.
 - Par exemple, pour 12 souches, 4 ml d'alcool absolu EtOH + 1 ml d'eau = 5 ml d'EtOH à 80 %
- Centrifuger la plaque à l'aide d'une centrifugeuse à plaques, pendant environ 1 minute.
- Passer au vortex la suspension de billes Ampure XP pendant 30 secondes.
- Ajouter 30 µl (**15 µl**) de suspension de billes Ampure XP à chaque puits.
- Mélanger dans un agitateur pendant 2 minutes à 1 800 tours/minute.
- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- Placer la plaque dans un support magnétique et attendre environ 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant devienne clair.
- Maintenir la plaque dans le support magnétique et prélever avec précaution le surnageant dans le tube de déchets (90 µl dans une pipette). Veiller à ne pas toucher les billes magnétiques.
- Maintenir la plaque dans le support magnétique et laver les particules avec de l'éthanol à 80 %, rangée par rangée (conseil : tenir la plaque lors du pipetage, ne pas toucher les billes magnétiques, mais pipeter de l'autre côté du tube) :
 - Ajouter 180 µl (**200 µl**) d'éthanol à 80 % dans chaque puits. Ne pas remettre les perles en suspension !
 - Incuber pendant 30 secondes.
 - Prélever le surnageant (220 µl dans une pipette).
- Répéter le lavage comme indiqué ci-dessus.
- Retirer soigneusement l'éthanol restant (50 µl dans une pipette) et laisser sécher le culot pendant 5 (**3**) minutes à température ambiante sans film protecteur.
- Retirer la plaque du support magnétique et ajouter 53 µl (**26,4 µl**) de RSB dans chaque puits (sélectionner le réglage du pipetage/mélange de la pipette électronique ou pipeter dix fois doucement d'avant en arrière pour mélanger correctement les billes). Il est possible de centrifuger brièvement la plaque à l'aide d'une centrifugeuse à plaques ou de s'assurer par pipetage que le liquide se trouve au fond du tube. Il est possible d'utiliser le tampon EB au lieu du RSB si nécessaire.
- Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
- Placer la plaque dans le support magnétique et attendre environ 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant devienne clair.
- Préparer deux nouvelles plaques 24 puits :
 - CAN (=plaque NTA amplifiée propre (backup), se conserve 1 semaine -15 °C à 25 °C)
 - LNP (=Library Normalization plate, plaque de normalisation pour les bibliothèques)
- Transférer 20 µl (**environ 15 µl pour la plaque LNP et environ 8 µl pour la plaque CAN**) de surnageant de chaque puits dans les deux nouvelles plaques.

5.3 Normalisation de la bibliothèque

Méthode Qubit+Bioanalyzer

La normalisation des bibliothèques est principalement effectuée avec les tests Qubit+BioAnalyzer. La normalisation peut également être effectuée à l'aide de la méthode des billes magnétiques, dont les instructions sont disponibles sous le titre *Normalisation de la bibliothèque à l'aide de la méthode des billes magnétiques (à base de billes)*.

- Prendre de la glace et sortir la plaque CAN pour la décongeler.

Mesure de la concentration avec Qubit

- Mesurer la concentration de la plaque CAN à l'aide de l'instrument Qubit et du kit ADNdb HS Qubit.
- Compter le nombre nécessaire de tubes Qubit (0,5 ml).
- Diluer la quantité nécessaire de solution de travail Qubit.
- Le réactif ADNdb HS Qubit est dilué au 1:200 dans le tampon ADNdb HS Qubit. Calculer 199 µl de tampon et 1 µl de réactif par échantillon. Étant donné que le tampon mousse facilement, il peut être nécessaire de calculer une marge de pipetage d'1 fois.
- Les normes sont mesurées à chaque fois.
- Pipeter la solution de travail dans les tubes :
 - Étalon : 190 µl de solution de travail + 10 µl d'étalon
 - Échantillon : 198 µl de solution de travail + 2 µl d'ADN extrait
- Passer les tubes au vortex pendant 2 à 3 secondes et incuber pendant 2 minutes à température ambiante.
- Mesure de l'échantillon avec l'instrument Qubit (REMARQUE ! Ne pas tenir les tubes dans la main pendant une longue période, car l'augmentation de la température affecte le résultat.)
 - Toucher l'écran pour allumer l'instrument Qubit.
 - Sélectionner dsDNA (ADNdb)-> sélectionner dsDNA High Sensitivity (ADNdb Haute Sensibilité)
 - Choisir de lire les nouveaux étalonnages, c'est-à-dire les échantillons-types. Appuyer sur Yes (Oui) et placer le premier tube standard dans la machine, puis appuyer sur Read (Lire). Supprimer étalon 1# et lire étalon 2#.
 - Lire les échantillons en sélectionnant Read/Read Next Sample (Lire/Lire l'échantillon suivant). La valeur qui apparaît à l'écran indique la concentration d'ADN dans le tube. Appuyer sur Calculate Stock Conc. (Calculer la concentration de la solution de réserve) pour connaître la concentration en ADN de l'échantillon. Sélectionner la quantité d'ADN pipetée (généralement 2 µl) et l'unité ng/µl, pour afficher la concentration d'ADN de l'échantillon. Enregistrer le résultat. Il est également possible d'enregistrer les résultats en appuyant sur Save (Enregistrer) et de les transférer sur un ordinateur à l'aide d'une clé USB.
- Après avoir enregistré le résultat, appuyer sur Read Next Sample (Lire l'échantillon suivant) pour lire l'échantillon suivant.
- Les valeurs Qubit doivent être comprises entre 4 et 6 ng/µl pour l'analyse du Bioanalyzer. Si les valeurs sont supérieures à 10 ng/µl, diluer par exemple 1:2 dans le tampon RSB ou le tampon EB (2 µl d'ADN + 4 µl de RSB) pour l'analyse, ou si la valeur du qubit est d'environ 20 ng/µl, diluer 1:4 (2 µl d'ADN + 8 µl de RSB).

- Critère d'acceptation : si les concentrations de toutes les souches de la bibliothèque sont inférieures à 1 ng/μl, la préparation de la bibliothèque est répétée. Une concentration d'environ 1 ng/μl peut être acceptée pour les souches individuelles et, dans ce cas, la souche est mise en pool sans être diluée.

Essai par bioanalyseur

- Une analyse BioAnalyzer peut contenir 11 souches. S'il y a plus de 11 souches dans la bibliothèque, la taille moyenne calculée de la souche (soit la taille de la même espèce dans la même analyse, soit la taille moyenne de 1 000 pb) est ajoutée à la table de normalisation.
- REMARQUE ! Le kit contient du diméthylsulfoxyde (DMSO), qui se lie à l'acide nucléique et est par conséquent un mutagène potentiel. Utiliser des gants en nitrile ! Les déchets sont collectés comme des déchets dangereux dans leur propre sac sous une hotte.
- Mettre les réactifs à température ambiante au moins 30 minutes avant de commencer et protéger les réactifs de la lumière.
- Allumer l'instrument.
- Laver toujours les électrodes du Bioanalyzer avant et après une analyse. Laver également entre les analyses.
 - Prendre la plaque de lavage et la charger lentement avec 400 μl d'eau milliQ à travers un puits. L'eau se répand sur toute la plaque.
 - Placer la plaque de lavage dans l'instrument et fermer le couvercle pendant environ 10 secondes.
 - Retirer la plaque de lavage et laisser le couvercle ouvert pendant environ 10 secondes pour permettre à l'eau de s'évaporer des électrodes avant de refermer le couvercle.
 - Conserver la plaque de lavage dans une boîte de stockage Eppendorf vide ou dans un sac minigrip.
 - Utiliser toujours une nouvelle plaque de lavage lors de l'utilisation d'un nouveau kit.
- Préparer le gel (1 gel permet de réaliser 4 analyses complètes) :
- Ajouter 15 μl de colorant ADN Haute Sensibilité (**bouchon bleu**) dans le tube de matrice de gel ADN Haute Sensibilité (**bouchon rouge**), passer au vortex et faire tourner le liquide jusqu'au fond du tube.
- Transférer la solution dans le tube à filtre et centrifuger à 6 000 tours/minute (2 240 g+-20 %) pendant 10 minutes. Étiqueter le tube avec la date de préparation, protéger la solution de la lumière et la conserver à +4 - +8 °C dans un réfrigérateur. Le gel se conserve pendant 6 semaines après sa préparation.
- Charger le gel sur la plaque :
 - En cas d'utilisation de gel déjà fabriqué, le laisser se réchauffer pendant 30 minutes à température ambiante avant de l'utiliser.
 - Prendre une nouvelle plaque d'ADN Haute Sensibilité et la placer dans le dispositif de chargement du gel.
 - Pipeter 9 μl du gel dans le puits marqué G (blanc à l'intérieur du cercle noir).



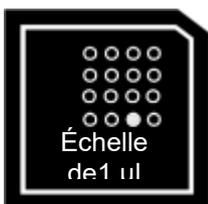
- Vérifier que le piston de la seringue est à 1 ml et fermer le dispositif de chargement du gel.
- Pousser le piston vers le bas jusqu'à ce que le clip maintienne le piston en place. Attendre 60 s et relâcher le piston.
- Attendre 5 s que le piston monte de lui-même.
- Ouvrir avec précaution le dispositif de chargement du gel (tenir la plaque d'une main).
- Pipeter 9 µl de gel dans les autres puits marqués d'un G (3 pièces).



- Charger le marqueur sur la plaque :
 - Pipeter 5 µl de marqueur (**bouchon vert**) sur la plaque dans tous les puits d'échantillons et dans les puits de marqueur. Ne laisser aucun puits vide.



- Charger le marqueur de taille et les échantillons sur la plaque
 - Pipeter 1 µl de l'échelle (**bouchon jaune**) dans le puits marqué d'une échelle.



- Pipeter 1 µl de chaque échantillon dans les 11 puits d'échantillons. Pipeter 1 µl de marqueur dans les puits où aucun échantillon ne sera placé.



- Placer la plaque dans le vortex prévu à cet effet et passer au vortex pendant 1 min à 2 400 tours/minute (il est possible de régler les tours/minute, mais le temps est automatiquement de 1 minute).
- Démarrer l'analyse Bioanalyzer dans les 5 minutes qui suivent la fin de la plaque.

Démarrage de l'analyse avec Agilent 2100 Bioanalyzer

- S'assurer d'avoir lavé les électrodes avant l'analyse.
- Ouvrir le programme 2100 Expert et sélectionner l'instrument DE13804121 BioAnalyzer 1 ou DEDAE02199 BioAnalyzer 2 -> assays (essais) -> Electrophoresis (Électrophorèse) -> dsDNA (ADNdb) -> High sensitivity DNA (ADN Haute Sensibilité).
- Saisir le nom des échantillons (sample name) et choisir le nombre d'échantillons à analyser (Run sample).
- Placer la plaque dans l'appareil et fermer le couvercle.
- Lorsque l'appareil a reconnu la plaque et que tous les éléments de la liste de contrôle du démarrage de l'analyse sont verts, lancer l'analyse en appuyant sur Start (Démarrer) (une analyse avec 11 échantillons dure environ 40 minutes).
- Retirer la plaque immédiatement après l'analyse et ne pas la laisser, par exemple, pendant la nuit ou le week-end.
- Laver les électrodes comme indiqué ci-dessus.

Analyse des résultats

- Sous la barre Contexts (Contextes), sélectionner Data (Données)-> all samples (tous les échantillons).
- Modifier les valeurs de sorte que Global : seuil de pente 20.
- Region Table (Illumina recommande) -> Inspecter la plage 400 à 3 000 pb. Ajuster la valeur vers la droite : cliquer sur l'un des échantillons et cliquer sur l'image avec le bouton droit de la souris. Sélectionner « modify region » (modifier la région) et changer les valeurs à 400 et 3 000. Il est également possible de modifier la valeur de tous les échantillons à la fois : All samples (Tous les échantillons) > menu sur la droite, global > advanced (avancé) > sample setpoints (points de consigne échantillon) > smear analysis (analyse du prélèvement) > régions > définir la valeur souhaitée dans la fenêtre 400 à 3 000 pb, puis appuyer sur ok.
- En cas de difficultés à trouver les standards de taille, il est possible de les définir manuellement (il doit y avoir 15 pics). Tout d'abord, sélectionner le pic le plus bas et le plus haut de l'échelle. Cela peut suffire dans certains cas.
- S'il n'y a pas 15 pics de l'échelle et qu'il n'est pas possible de les ajouter, il faut recommencer l'analyse.

- Échelle -> Table de pics. Si un pic a une valeur de 0 (un pic sans taille), cliquer avec le bouton droit de la souris -> intégration manuelle -> ajouter un pic pour ceux qui n'ont pas de valeur.
- Si l'analyse n'est toujours pas réussie et que des messages d'erreur sont visibles, répéter l'analyse Bioanalyzer.
- S'il s'agit d'un problème de « migration tardive », ouvrir la table des pics de cet échantillon et aller au marqueur supérieur, cliquer avec le bouton droit de la souris sur « Manually Set Upper marker » (Définir manuellement le marqueur supérieur). Cela devrait résoudre le problème.
- Les pics du marqueur doivent être visibles et le pic de la bibliothèque doit rester entre les pics du marqueur. Le pic de la bibliothèque doit être relativement étroit et net, mais sa forme n'est pas déterminante pour le succès du séquençage.
- Si la migration de la bibliothèque échoue (taille moyenne de la souche sur 1 200 pb), la taille moyenne calculée de la souche (1 000 pb) est ajoutée à la table de normalisation.
- Enregistrer la taille moyenne des échantillons et saisir les tailles.
- Enregistrer l'analyse au format PDF sur un lecteur de disque approprié et dans un dossier à l'aide de la fonction d'impression.
- Éteindre l'instrument.
- Congeler la plaque CAN à -15 °C-25 °C et procéder à la normalisation avec la plaque LNP.

Normalisation de la bibliothèque par la méthode des billes magnétiques (à base de billes)

- La normalisation à l'aide de la méthode des billes magnétiques n'est effectuée que pour les bibliothèques qui ont été préparées avec des quantités complètes de réactifs.
 - Préparer **chaque fois du NaOH 0,1 M frais**, à raison de 30 µl/échantillon. Par exemple 100 µl de 1 M NaOH + 900 µl d'eau.
 - Remarque ! Le 1 M NaOH ne dure que 2 semaines, après quoi une nouvelle solution de réserve doit être dissoute.
- Les étapes qui utilisent les réactifs LNA1 et LNW1 sont effectuées **sous la hotte** de la salle post-PCR, car ils contiennent du formamide. Mettre tous les déchets contenant du formamide (liquides, pointes de pipette) dans le conteneur à déchets de formamide ! Utiliser des gants en nitrile et un manteau de protection.
- Décongeler les LNA1 (=Library Normalization Additives, ou additifs de normalisation de bibliothèque). Une fois les LNA1 à température ambiante, utiliser soigneusement le vortex pour s'assurer que tous les précipités sont dissous.
- Sortir les LNB1 (=Library Normalization **B**eads, ou billes de normalisation de la bibliothèque) et LNW1 (=Library Normalization **W**ash, ou lavage de normalisation de la bibliothèque) du réfrigérateur et les amener à température ambiante.
- S'assurer que le LNS1 (=Library Normalization Storage buffer, ou tampon de stockage de normalisation de bibliothèque) est à température ambiante avant de commencer (conservation à température ambiante).
- Mélanger au vortex les LNB1 pendant au moins 1 minute ou jusqu'à ce qu'aucun précipité ne soit visible au fond.
- Pipeter **44 µl** de LNA1 **par échantillon** dans un tube Eppendorf propre de 1,5 ml. IL N'EST PAS NÉCESSAIRE DE COMPTER LA MARGE DE PIPETAGE !

- Pipeter le LNB1 d'avant en arrière 10 à 15 fois pour mélanger correctement les billes. Transférer **8 µl** de LNB1 fraîchement mélangé **par échantillon** dans le tube Eppendorf contenant le LNA1.
- Mélanger en pipétant d'avant en arrière et distribuer 45 µl dans chaque puits d'échantillon LNP de la plaque.
- Couvrir la plaque du puits avec un film protecteur et l'agiter dans un agitateur de plaques à 1 800 tours/minute pendant exactement 30 minutes.
- Centrifuger rapidement dans une centrifugeuse à plaques et placer la plaque dans un support magnétique pendant 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
- Retirer soigneusement le surnageant (70 µl dans une pipette).
- Retirer la plaque du support magnétique et laver les billes avec LNW1 comme suit (effectuer le pipetage sous la hotte) :
 - Ajouter 45 µl de LNW1 dans chaque puits d'échantillon et couvrir les puits avec un film protecteur. Agiter dans un agitateur de plaques à 1 800 tours/minute pendant 5 minutes. Essorer rapidement à l'aide d'une centrifugeuse à plaques en cas de bulles dans les tubes ou si le liquide ne se trouve pas entièrement au fond. Placer la plaque dans le support magnétique et attendre 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Retirer soigneusement le surnageant (70 µl dans une pipette).
 - Répéter le lavage comme indiqué ci-dessus. Veiller à retirer tous les LNW1 après le deuxième lavage.
- Il est possible d'effectuer les étapes suivantes sur la paillasse.
- Retirer la plaque du support magnétique et ajouter 30 µl de NaOH 0,1 M à chaque puits d'échantillon. Remettre en suspension le culot en pipétant d'avant en arrière.
- Couvrir les puits d'un film protecteur et agiter dans un agitateur de plaques à 1 800 tours/minute pendant 5 minutes.
- Préparer une nouvelle plaque 24 puits en la marquant SGP (= storage plate, ou plaque de conservation) et en découpant un film protecteur de taille appropriée.
- Si nécessaire, centrifuger rapidement à l'aide d'une centrifugeuse à plaques, puis placer la plaque dans un support magnétique pendant 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
- Pendant ce temps, ajouter 30 µl de LNS1 dans chaque puits de la plaque SGP.
- Transférer 30 µl de surnageant de la plaque LNP vers la plaque SGP.
- Couvrir la plaque SGP d'un film protecteur, passer au vortex pendant environ 5 secondes et centrifuger rapidement dans une centrifugeuse à plaques.
- Conserver la plaque au congélateur (-15 °C-25 °C) jusqu'à la mise en pool (1 à 3 semaines).

5.4 Dilution et mise en pool des bibliothèques

Préparation et dénaturation de la solution de réserve PhiX à 20 pM (contrôle de fonctionnement) :

- Ajouter dans un tube Eppendorf :
 - 2 µl de la bibliothèque PhiX 10 nM
 - 3 µl 10mM Tris-Cl, pH 8,5, 0,1 % Tween 20
 - 5 µl de NaOH 0,2 M frais
- Passer au vortex et centrifuger pendant environ 1 minute, puis incubé le tube à température ambiante pendant 5 minutes.
- Diluer la solution à un volume de 20 pM en ajoutant 990 µl de tampon HT1 froid dans le tube.

- La solution reste en place pendant 3 semaines.

Mise en pool des bibliothèques (après normalisation des bibliothèques par la méthode Qubit+Bioanalyzer)

- En général, la concentration souhaitée pour la mise en pool est de 4 nM (pour une bibliothèque réduite de moitié et complète, ou de 2 nM pour une bibliothèque de longue durée) et le volume souhaité est de 20 μ l.
- Après avoir saisi les résultats du Qubit et du Bioanalyzer dans la table de dilution, il est possible d'effectuer les dilutions de la plaque LNP dans le tampon EB ou RSB dans une nouvelle plaque 24 puits. Mélanger au vortex et faire tourner brièvement.
- Pré-étiqueter cinq tubes Eppendorf de 1,5 ml (Pool 1, Pool 2, Pool 3, NaOH 0,2 M et PhiX 12,5 pM).
- Préparer du NaOH 0,2 M frais dans un tube Eppendorf (200 μ l de NaOH 1 M + 800 μ l d'eau HyClo).
- **Pool 1** : Pipeter 5 μ l de chaque échantillon dilué dans un tube Eppendorf propre, passer au vortex et faire tourner.
- En cas de valeurs négatives à partir du tableau de dilution, il est possible de mettre en pool l'échantillon non dilué de 5 μ l (le marquer dans le tableau).
- **Pool 2** : prélever 5 μ l de la bibliothèque mise en pool (pool 1) et 5 μ l de NaOH 0,2 M frais (200 μ l de NaOH 1 M + 800 μ l d'eau HyClo), puis incuber à température ambiante pendant 5 min.
- Ajouter 990 μ l de tampon HT1, de sorte que la concentration de la bibliothèque soit de 20 pM.
- **Pool 3 (12 pM)** : Diluer davantage la bibliothèque (généralement la bibliothèque de longue durée) : prendre 360 μ l 20 pM de la bibliothèque + 240 μ l de tampon HT1. La concentration de la bibliothèque est maintenant de **12 pM OU**
- **Pool 3 (15 pM)** : Diluer davantage la bibliothèque (bibliothèque divisée en deux ou non) : prendre 450 μ l 20 pM de bibliothèque + 150 μ l de tampon HT1. La concentration de la bibliothèque est maintenant de **15 pM**.
- **Pool 3 (10 pM)** : Diluer davantage la bibliothèque : prendre 300 μ l de bibliothèque 20 pM + 300 μ l de tampon HT1. La concentration de la bibliothèque est maintenant de **10 pM**.
- Diluer le contrôle 20 pM PhiX dans le tampon HT1 (37,5 μ l 20 pM PhiX+22,5 μ l de tampon HT1).
- Ajouter 6 μ l de contrôle PhiX 12,5 pM à la bibliothèque mise en pool (pool 3).
- Pipeter 600 μ l dans la chambre de la cartouche d'analyse et lancer l'analyse conformément au point 7.2.6.

Mise en pool des bibliothèques (après normalisation des bibliothèques par la méthode des billes magnétiques)

- Prélever de la glace et chauffer le bloc de chauffe à 96 °C pour la dénaturation. Sortir la bibliothèque et la solution de réserve PhiX pour les décongeler sur la glace.
- Ensuite, combiner les bibliothèques (pool) comme suit :
 - Étiqueter un tube Eppendorf propre avec les lettres PAL (pooled Amplified library ou bibliothèque amplifiée mise en pool) et transférer 5 μ l de chaque échantillon de la plaque SGP dans le tube PAL, passer au vortex et centrifuger brièvement.
 - Étiqueter le tube Eppendorf à **bouchon à vis** avec les lettres DAL (=diluted Amplified library ou bibliothèque amplifiée diluée) et pipeter 600 μ l de tampon HT1 dans le tube DAL.

- Transférer 23 µl du tube PAL au tube DAL. Pipeter d'avant en arrière 3 à 5 fois.
- Passer le tube DAL au vortex et centrifuger rapidement.
- Incuber dans le bloc de chauffe à 96 degrés pendant exactement 2 minutes.
- Placer le tube sur de la glace immédiatement après. Garder le tube sur de la glace pendant au moins 5 minutes ou jusqu'à son chargement dans la cartouche de réactifs.
- Utilisation du contrôle PhiX : La solution de réserve de 20 pM est diluée à 12,5 pM -> 37,5 µl de PhiX 20 pM + 22,5 µl de HT1.
- Ajouter 6 µl de 12,5 pM de contrôle PhiX au tube DAL, ce qui donne une concentration d'environ 1 %.
- Le temps écoulé entre la dénaturation et le chargement de la cartouche doit être aussi court que possible.

5.5 Préparation de la cartouche de réactifs, utilisation de l'instrument MiSeq et démarrage de l'analyse

- Sortir la cartouche de réactifs et le HT1 (tampon d'hybridation) du congélateur pour les décongeler à +4 °C la veille. La cartouche peut également être décongelée à température ambiante ou dans de l'eau tiède (1 heure) si, par exemple, il faut s'assurer que la bibliothèque a réussi. Il faut toujours s'assurer avant utilisation que les réactifs contenus dans la cartouche sont complètement fondus. Lorsque le tampon HT1 a fondu, le conserver au réfrigérateur jusqu'à son utilisation. Conserver également la cartouche de réactifs décongelée au réfrigérateur jusqu'à ce que l'échantillon soit chargé.
- Le cycle d'alimentation doit être effectué avant l'analyse, et il est bon d'effectuer un lavage après l'analyse (20 minutes) afin que le flux de liquide de l'instrument fonctionne correctement. (Instructions : Annexe C).
- Enregistrer une feuille d'échantillons sur l'instrument : ouvrir le programme LRM avec l'appareil Miseq → Cliquer sur Create Run (Créer une analyse) dans le coin supérieur droit et GenerateFASTQ (Générer FASTQ) → Sélectionner Import Sample Sheet (Importer une feuille d'échantillon) dans le coin supérieur gauche et rechercher la feuille d'échantillons de votre analyse dans un dossier → Pour finir, sélectionner Save Run (Enregistrer l'analyse) dans le coin inférieur droit.
- Ouvrir le programme Illumina, Cliquer sur Sequence → Cliquer sur Open Local Run Manager (Ouvrir Local Run Manager) → Cocher Use BaseSpace™ Sequence Hub (Utiliser BaseSpace™ Sequence Hub) pour cette analyse et Run analysis, collaboration, and storage (Exécuter l'analyse, la collaboration et le conservation) → Ensuite → se connecter. Sélectionner « Next » (Suivant).
 - MiSeq demande d'installer la cuve de circulation fournie avec la trousse de réactifs.
 - Sortir la cuve de circulation de son étui et rincer soigneusement l'eau salée avec de l'eau. NE PAS TOUCHER LE POINT NOIR (joint d'orifice de la cuve de circulation). Sécher délicatement avec du papier Kimwipe.
 - Il est également possible d'essuyer le verre avec de l'EtOH à 80 % sur du papier non pelucheux. Les rayures, bulles, empreintes digitales ou peluches de papier ne doivent pas être visibles sur le verre. Lorsque le verre est complètement transparent, retirer l'ancien verre et insérer le nouveau dans l'instrument. S'assurer que MiSeq peut lire le code sur la cuve de circulation. Puis, sélectionner « Next » (Suivant).

- Ensuite, MiSeq demande de vider le conteneur de déchets et d'installer à sa place le flacon de réactifs PR2 fourni avec la cuve de circulation. Retourner délicatement le réactif PR2 plusieurs fois et le placer dans l'instrument. Attendre que le MiSeq lise le code au fond du flacon. Sélectionner « Next » (Suivant).
- MiSeq demande de charger une cartouche de réactifs. Vérifier que les réactifs sont fondus et mélangés correctement. Les précipités ne doivent pas être visibles dans les réactifs. Le retourner doucement une dizaine de fois pour mélanger les réactifs. NE PAS SECOUER ! Tapoter la cartouche de réactifs contre la table pour éliminer les bulles d'air.
- Utiliser une pointe de pipette de 1 000 µl et casser le film protecteur sur le dessus de la chambre d'échantillon marqué en orange « LOAD SAMPLES ».
- Pipeter 600 µl d'échantillon du tube Pool 3/DAL dans la chambre de la cartouche d'échantillons et transférer immédiatement la cartouche dans le MiSeq.
- Sélectionner « Change sample sheet » (Changer la feuille d'échantillons), puis importer votre propre fichier depuis le bureau (s'il est nommé avec le code de la cartouche, MiSeq peut le trouver automatiquement).
- Sélectionner « Save and continue » (Enregistrer et continuer), puis « Next » (Suivant).

Attendre que MiSeq ait vérifié que tout est correct et que les approbations vertes apparaissent à l'écran. Si tout est en ordre, appuyer sur « Démarrer l'analyse » (Start Run).

Il est possible de suivre la progression de l'analyse dans BaseSpace d'Illumina en temps réel depuis votre ordinateur.

(<https://euc1.sh.basespace.illumina.com/home/index>).

Fin de l'analyse

Une fois l'analyse terminée, le lavage de la ligne des modèles est effectué (Annexe C). Lors du lavage, le conteneur à déchets est vidé de l'instrument dans le conteneur à déchets de formamide situé dans la hotte (ne pas oublier les gants en nitrile et la blouse de protection). Le puits numéro 8 de la cartouche de réactifs est vidé dans le conteneur de déchets de formamide à l'aide d'une pipette Pasteur jetable, après quoi la cartouche peut être jetée parmi d'autres déchets.

5.6 Assurance qualité des lectures de séquences et du téléchargement des données de séquences

La qualité et la réussite de l'analyse sont évaluées dans BaseSpace d'Illumina à l'aide de divers paramètres. Les plus importants d'entre eux sont la densité des clusters (densité des clusters sur la cuve de circulation, optimum 800 à 1200 K/mm²), Cluster PF % (accès des clusters à travers le filtre, généralement >85 %) et Q30 total % [mesure la possibilité d'erreurs dans la détermination des bases spécifiques (=Base Call), plus elle est élevée, mieux c'est, généralement >90 %]. Ces paramètres d'analyse sont enregistrés. Un nombre suffisant de lectures passant par le cluster (lit le filtre de passage, Lit PF) indique un séquençage réussi (24 à 30 millions de Lectures appariées).

Chaque espèce de bactérie est analysée selon des instructions distinctes. Des paramètres d'analyse sous-optimaux n'empêchent pas nécessairement la réussite de l'analyse du génome. Le succès du séquençage est déterminé définitivement dans les processus d'analyse et selon les critères qui y sont définis. Si l'analyse

de la souche n'est pas concluante selon les critères et les limites fixés, la bibliothèque et le séquençage seront refaits pour la souche.

Utilisation du contrôle PhiX :

PhiX permet un contrôle de qualité interne, qui surveille le succès du séquençage (nous testons qu'une certaine séquence connue, phiX, est obtenue correctement et qu'il n'y a pas d'erreurs, Base Call).

Habituellement, 1 % de contrôle PhiX est chargé dans l'analyse et le nombre d'erreurs dans son séquençage ne doit pas dépasser 6 % (recommandation d'Illumina).

Paramètres recommandés pour différents kits :

http://www.illumina.com/systems/miseq/performance_specifications.html

Les séquences sont téléchargées à partir du serveur BaseSpace si celui-ci est utilisé. Les données de séquence sont également conservées localement dans le MiSeq et les fichiers de séquence peuvent être téléchargés et conservés ailleurs.

6. Conservation des données séquentielles

Les données séquentielles nécessitent un espace de conservation adéquat. Par exemple, il faut compter environ 400 à 500 mégaoctets pour une paire de lectures fastq gz compressées du génome entier de *Vibrio cholerae* séquencé à l'aide de MiSeq et d'un kit de 300 cycles visant une couverture moyenne de 100 x du génome assemblé. Un système de conservation doit être capable de gérer et de traiter des quantités croissantes de données. Le système doit être bien documenté afin qu'un seul fichier de séquence puisse être retracé et récupéré à partir du système en cas de besoin.

7. Références

- Caburao EA. 2024. Comprendre les bonnes pratiques en matière de gestion des matières dangereuses. Culture de la sécurité. Disponible à l'adresse suivante : <https://safetyculture.com/topics/hazardous-substances/hazardous-materials-management/> Consulté le : 18 décembre 2024
- CDC. 2024a. Formations à la biosécurité. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/safe-labs/php/biosafety-training/index.html> Consulté le : 18 décembre 2024
- CDC. 2024b. Gestion des risques biologiques. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/safe-labs/php/biorisk-management/index.html> Consulté le : 18 décembre 2024
- CDC. 2024c. Processus progressif pour améliorer les systèmes de gestion des risques biologiques. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/safe-labs/php/echo-biosafety/stepwise-process-improve-biorisk-management-systems.html> Consulté le : 18 décembre 2024
- CDC. 2024d. Processus d'évaluation des risques biologiques. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/safe-labs/php/biological-risk-assessment/process.html> Consulté le : 18 décembre 2024
- CDC. 2024e. Évaluation des risques biologiques. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/safe-labs/php/biological-risk-assessment/index.html> Consulté le : 18 décembre 2024
- Santé et sécurité environnementales. 2024. Exigences en matière d'équipement de protection individuelle pour les laboratoires. Disponible à l'adresse suivante : <https://ehs.ncsu.edu/laboratory-safety/personal-protective-equipment-requirements-for-laboratories/> Consulté le : 18 décembre 2024
- Harwood V, Gandhi J, Wright A. 2004. Méthodes d'isolement et de confirmation de *Vibrio vulnificus* dans les huîtres et les sources environnementales : examen. *Journal of Microbiological Methods* 59 (2004) 301–316. doi :10.1016/j.mimet.2004.08.001.
- Heljanko V, Tyni O, Johansson V, Virtanen J-P, Räisänen K, Lehto K-M, Lipponen A, Oikarinen S, Pitkänen T, WastPan Study Group et Heikinheimo A. 2024. Types de séquences cliniquement pertinentes d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémases détectées dans les eaux usées finlandaises en 2021-2022. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* (2024) 13:14. <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01370-z>.
- Henderson T. 2009. Équipement de protection individuelle en laboratoire. Directeur de laboratoire. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.labmanager.com/personal-protective-equipment-in-the-lab-20269> Consulté le : 18 décembre 2024
- Organisation internationale de normalisation (ISO). 2000. ISO 7899-2:2000. Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des entérocoques intestinaux. Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane.
- Organisation internationale de normalisation (ISO). 2006. ISO 19458:2006 Qualité de l'eau - Échantillonnage pour l'analyse microbiologique.
- Organisation internationale de normalisation (ISO). 2010. ISO 19250:2010 Qualité de l'eau - Détection de *Salmonella* spp.

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2014. ISO 11133:2014 Microbiologie des denrées alimentaires, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, conservation et essais de performance des milieux de culture.

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2014. ISO 9308-1:2014 Qualité de l'eau - Dénombrement des bactéries *Escherichia coli* et coliformes. Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries non ciblées.

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2017. ISO 21872-1 (ISO 21872-1:2017 Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la détermination des *Vibrio* spp. Partie 1 : Détection des *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* potentiellement entéropathogènes).

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2018. ISO 8199:2018 Qualité de l'eau - Exigences générales et lignes directrices pour les examens microbiologiques sur milieu de culture.

Organisation internationale de normalisation (ISO). 2023. ISO 7704:2023 Qualité de l'eau - Exigences relatives aux essais de performance des membranes filtrantes utilisées pour le dénombrement direct des micro-organismes par des méthodes de culture.

Liu P, Ibaraki M, VanTassell J, Geith K, Cavallo M, Kann R, Guo L, Moe CL. 2022. Une méthode sensible, simple et peu coûteuse pour la surveillance des eaux usées COVID-19 au niveau institutionnel. *Science of The Total Environment* 807:151047. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151047>.

Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, Nair GB, Shimada T, Ghose AC. 2000. Méthode rapide d'identification spécifique de *Vibrio cholera* à l'aide d'amorces ciblées sur le gène de la protéine de la membrane externe *OmpW*. *J. Clin. Microbiol.* 38:4145-4151.

National Institutes of Health (NIH, Instituts nationaux de la santé). 2023. Manuel de biosécurité en laboratoire BSL-2 et BSL 2/3. Disponible à l'adresse suivante : <https://ors.od.nih.gov/sr/dohs/Documents/bsl-2-lab-safety-manual.pdf> Consulté le : 18 décembre 2024

Rafiee M, Isazadeh S, Mohseni-Bandpei A, Mohebbi SR, Jahangiri-Rad M, Eslami A, Dabiri H, Roostaei K, Tanhaei M, Amereh F. 2021. L'écouvillon de Moore est aussi performant que le composite et plus performant que l'échantillonnage instantané pour la surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. *Science of The Total Environment* 790:148205. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148205>.

Schang C, Crosbie ND, Nolan M, Poon R, Wang M, Jex A, John N, et al. 2021. Échantillonnage passif du SARS-CoV-2 pour la surveillance des eaux usées. *Environmental Science & Technology* 55 (15) : 10432–41. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c01530>.

Comité permanent des analystes. 2016. Microbiologie des eaux récréatives et environnementales (2016) - Partie 9 - Méthodes d'isolement de *Yersinia*, *Vibrio* et *Campylobacter* par enrichissement sélectif. Méthodes d'examen des eaux et des matières connexes. <https://standingcommitteeofanalysts.co.uk/microbiology-working-group/> Consulté le : 18 décembre 2024

Université de Chicago. Formation à la sécurité biologique. Disponible à l'adresse suivante : <https://researchsafety.uchicago.edu/training/biological-safety-training/> Consulté le : 18 décembre 2024

Université de Washington. 2019. Outil d'évaluation des risques en laboratoire. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.ehs.washington.edu/resource/laboratory-risk-assessment-tool-lab-rat-843>
Consulté le : 18 décembre 2024

Tiwari A, Lehto KM, Paspaliari D, Al-Mustapha A, Sarekoski A, Hokajärvi A-M, Länsivaara A, Hyder R, Luomala O, Lipponen A, Oikarinen S, Heikinheimo A, Pitkänen T et WastPan Study Group. 2024. Élaboration de systèmes de surveillance des eaux usées pour plusieurs agents pathogènes : Projet WastPan en Finlande. Science of The Total Environment 926 (2024) 171401. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171401>

ANNEXES



ODIN

RENFORCER LA SURVEILLANCE
ENVIRONNEMENTALE POUR PROMOUVOIR LES
ACTIONS DE SANTÉ PUBLIQUE EN AFRIQUE

ANNEXE A. Formulaire de collecte d'échantillons

FORMULAIRE DE COLLECTE D'ÉCHANTILLONS

Sur le terrain :

1. Nom de la (des) personne(s) chargée(s) de l'échantillonnage :

2. Lieu d'échantillonnage (ville, municipalité, nom du lieu d'échantillonnage et point d'échantillonnage précis) :

3. Code de l'échantillon :

4. Date d'échantillonnage (jour/mois/année) et heure (heure/minute) :

5. Température de l'air au moment du prélèvement de l'échantillon : _____ °C

6. Température de l'échantillon d'eau au moment de la collecte de l'échantillon (Remarque ! À mesurer à partir d'une fraction de l'échantillon versée hors du récipient ; le thermomètre n'est pas stérile) : _____ °C

7. Le récipient d'échantillonnage est-il stérile ? Oui Non

8. Matrice d'échantillon :

Eau du robinet Eau de puits Eau de surface Eaux usées

9. Observations spécifiques liées à l'échantillonnage (par exemple, changements dans l'environnement proche, précipitations, etc.) :

REEMPLIR LE FORMULAIRE POUR L'ÉCHANTILLONNAGE DE L'EAU DU ROBINET (Questions 10 à 17)

10. Technique utilisée pour l'échantillonnage : Grappillage Passif
11. Le robinet est-il désinfecté avant l'échantillonnage ? Oui Non
Si oui, décrire comment : _____
12. Les dispositifs attachés et les inserts sont-ils retirés avant l'échantillonnage ?
Oui Non
13. L'eau du robinet a-t-elle été vidangée avant l'échantillonnage ? Oui Non
14. Volume total de l'échantillon d'eau prélevé ? _____ Litres ; Nombre de
conteneurs d'échantillons ? _____
15. L'échantillon contient-il du chlore résiduel ? Oui Non
16. Le chlore résiduel a-t-il été inactivé (généralement à l'aide de thiosulfate de
sodium) ?
Oui Non
17. D'autres observations ? Oui Non
Si oui, décrire :

REEMPLIR LE FORMULAIRE POUR L'ÉCHANTILLONNAGE DE L'EAU DU PUIT (Questions 18 à 20)

18. Technique utilisée pour l'échantillonnage : Grappillage Passif
19. Décrire le processus d'échantillonnage et l'équipement utilisé :

20. Autres observations (saison des pluies, saison sèche, etc.) ? Oui Non
Si oui, décrire :

REEMPLIR LE FORMULAIRE POUR L'ÉCHANTILLONNAGE DES EAUX DE SURFACE (Questions 21 à 23)

21. Technique utilisée pour l'échantillonnage : Grappillage Passif

22. Existe-t-il des installations susceptibles de rejeter des effluents chimiques en amont du point de collecte des échantillons ? Oui Non

Si oui, quel type d'établissement ?

23. Autres observations (saison des pluies, saison sèche, etc.) ? Oui Non

Si oui, décrire :

REEMPLIR LE FORMULAIRE POUR L'ÉCHANTILLONNAGE DES EAUX USÉES (Questions 24 à 27)

24. Type de station d'épuration des eaux usées/système d'assainissement ?

Ouvert Fermé

25. Technique utilisée pour l'échantillonnage : Grappillage Passif

26. Force de l'écoulement au moment de la collecte ?

Fort Faible Pas de débit

27. Autres observations (saison des pluies, saison sèche, etc.) ? Oui Non

Si oui, décrire :

En laboratoire

1. Nom de la personne qui reçoit l'échantillon au laboratoire :

2. Date (jour/mois/année) et heure (heure/minute) de réception de l'échantillon au laboratoire : _____

3. Température de l'échantillon d'eau au moment de l'arrivée de l'échantillon au laboratoire (Remarque ! Doit être mesurée à partir d'une fraction versée dans un tube de laboratoire après avoir mélangé le récipient de l'échantillon) :

_____ °C

4. L'échantillon présente-t-il quelque chose de notable ou d'inhabituel à l'arrivée ?

Oui Non

Si oui, décrire :

5. Date (jour/mois/année) et heure du début de l'analyse : _____

ANNEXE B. Réactifs et équipement de laboratoire pour le WGS bactérien

Réactifs

Extraction d'ADN et mesure de la concentration d'ADN

Réactif	Température	Phase de travail	Laboratoire d'infectiologie
Kit d'extraction d'ADN pour bactéries	En fonction du contenu du kit	Extraction d'ADN	x
Kit ADNdb BR Qubit	Température ambiante	Mesure de la concentration d'ADN	x

Préparation de la bibliothèque

Réactif	Nom spécifique	Inclus dans le kit Illumina Nextera XT	Température	Phase de travail	Pré-PCR	Post-PCR
Tampon TD	Tampon de marquage ADN	x	Congélateur -20 °C	Tagmentation	x	
ATM	Amplicon Tagment Mix, 96 RXN	x	Congélateur -20 °C	Tagmentation	x	
Tampon NT	Tampon de neutralisation du marquage	x	Température ambiante	Tagmentation	x	
NPM	Mélange maître Nextera PCR	x	Congélateur -20 °C	Index-PCR	x	
Index (amorces), Illumina			Congélateur -20 °C	Index-PCR	x	
AmPure XP			Réfrigérateur 2 à 8 °C	Purification du produit PCR		x
EtOH à 80 % (solution de réserve 96 à 99 %)			Dilution à partir d'EtOH à 96 %-99 %, température ambiante	Purification du produit PCR, Nettoyage de la cuve de circulation		x
RSB	Tampon de remise en suspension	x	Congélateur -20 °C	Purification du produit de la PCR		x
0,1 M NaOH (solution de réserve 1 M)			Solution de réserve 1 M NaOH (maximum 2 semaines) diluer 0,1 M juste avant	Normalisation de la bibliothèque		x

			utilisation, température ambiante			
LNA1	Additifs de normalisation de bibliothèque 1	x	Congélateur -20 °C	Normalisation de la bibliothèque		x
LNB1	Billes de normalisation de la bibliothèque 1	x	Réfrigérateur 2 à 8 °C	Normalisation de la bibliothèque		x
LNW1	Normalisation de la bibliothèque Lavage 1	x	Réfrigérateur 2 à 8 °C	Normalisation de la bibliothèque		x
LNS1	Tampon de conservation pour la normalisation de la bibliothèque 1	x	Température ambiante	Normalisation de la bibliothèque		x
Tampon EB (Qiagen)	10 mM Tris-Cl, pH 8,5		Température ambiante	Dilution de la bibliothèque		x
EDTA, 0,1 mM+Tris-HCl, 10 mM (tampon TE faible)	0,1 mM+Tris-HCl, 10 mM		Température ambiante	Dilution de l'ADN	x	
Eau exempte de nucléase	HyClone™ HyPure, qualité biologie moléculaire		Réfrigérateur 2 à 8 °C	Dilution d'EtOH		x

Séquençage Miseq

Réactif	Nom spécifique	Inclus dans le kit de réactifs Illumina Miseq	Température	Phase de travail	Pré-PCR	Post-PCR
Kit de réactifs MiSeq v2 (300 cycles)	MiSeq® v2 RGT Kit 300 cycles PE-Bx 1 sur 2	x	Congélateur -20 °C	Séquençage		x
	Kit de réactifs MiSeq® v2 Boîte 2 sur 2	x	Réfrigérateur 2 à 8 °C	Séquençage		x
Tween 20			Utiliser une dilution de 0,5 %, température ambiante	Lavage Miseq		x
Hypochlorite de sodium	NaOCl 5 %		Réfrigérateur 2 à 8 °C	Lavage de la ligne des		x

				modèles Miseq		
PhiX, Illumina			Congélateur -20 °C	Contrôle du séquençage		x

Option : Normalisation pour la bibliothèque

Réactif	Température	Phase de travail	Pré-PCR	Post-PCR
Kit ADNdb HS Qubit	Température ambiante	Mesure de la concentration en ADN de la bibliothèque		x
Kit ADN Haute Sensibilité Agilent	Température ambiante, réfrigérateur 2 à 8 °C	Mesure de la taille de la bibliothèque		x

Équipement

Équipement : Extraction d'ADN (en fonction de la méthode !)	Spécifications	Nombre	Pré-PCR	Post-PCR	Laboratoire d'infectiologie
Enceinte de biosécurité classe II		1			x
Centrifugeuse	Pour tubes de 1,5 ml	1		x	x
Mesure de la concentration d'ADN (par exemple Qubit)		1			x
Mélangeur thermique pour la méthode Magattract					
Équipement et plastiques : Préparation de la bibliothèque	Spécifications	Nombre	Pré-PCR	Post-PCR	Laboratoire d'infectiologie
Miseq		1		x	
Thermocycleur	Pour plaques 96 puits	2	x	x	
Vortex		2	x	x	
Centrifugeuse à plaques/essoreuse	Essoreuse, pour plaques 96 puits	2	x	x	
Centrifugeuse à tubes	Essoreuse, pour tubes de 1,5 ml	2	x	x	
Agitateur de plaques	Pour plaques 96 puits	1		x	
Pipettes	Différentes tailles : 1 à 10 ul, 10 à 100 ul, 20 à		x	x	

	200 ul, 100 à 1 000 ul				
Pointes de filtre pour pipettes			x	x	
Tubes Eppendorf de 1,5 ml			x	x	x
Plaques 96 ou 24 puits	Convient à l'instrument PCR		x	x	
Tubes Falcon de 50 ml				x	
Gants en nitrile			x	x	
Support magnétique	Pour plaques 96 puits	1		x	
Verre doseur de 100 ml				x	
Feuilles de couverture pour plaques 96 puits/feuilles adhésives pour plaques PCR			x	x	
Bloc chauffant +100 °C	Pour tubes de 1,5 ml	1		x	
Tubes spécifiques Qubit	0,5 ml		x		
Hotte fermée		1		x	
Armoire PCR ou équivalent		1	x		
Congélateur -20 °C		1	x	x	
Réfrigérateur 2 à 8 °C		1	x	x	
Pipette doseuse et pipeteur	10 ml, 25 ml	1		x	
Option : pour une normalisation basée sur la taille et la concentration	Spécifications	Nombre	Pré-PCR	Post-PCR	Laboratoire d'infectiologie
BioAnalyzer		1		x	
Qubit		1		x	
Centrifugeuse	Pour tubes de 1,5 ml	1		x	

ANNEXE C. Maintenance du dispositif MiSeq et cycles d'alimentation

CYCLE DE PUISSANCE

- Vous devez le compléter avant de commencer l'analyse
- Gérer -> Arrêter -> Lorsque l'écran est sombre, éteindre l'appareil au dos pendant plus de 60 secondes, puis le rallumer.

LAVAGE

GÉNÉRALITÉS

0,5 % de Tween 20 comme liquide de lavage dans tous les lavages.

- Préparer d'abord 50 ml de Tween 20 10 % (5 ml de Tween 20 + 45 ml de H₂O). La solution est suffisante pour deux lavages.
- Préparer 500 ml de cette solution de lavage (25 ml de Tween 20 à 10 % + 475 ml de H₂O) dans un flacon de lavage et mélanger en tournant.
- Pipeter environ 6 ml de solution de lavage du flacon dans chaque puits de la cartouche de lavage, de manière à ce qu'il reste au moins 350 ml de solution dans le flacon de lavage (ligne noire sur le côté du flacon).
- Placer la cartouche de lavage et le flacon de lavage dans l'appareil et, si nécessaire, vider correctement le flacon à déchets.

Après le lavage, laisser les flacons et les cartouches usagées dans la machine et noter les lavages effectués dans le journal d'utilisation.

LAVAGE APRÈS ANALYSE

- Effectuer un lavage avant chaque analyse, ce qui garantit la fonctionnalité de la circulation des fluides de l'instrument.
- Durée du lavage : environ 20 minutes

LAVAGE DE LA LIGNE DES MODÈLES (Lavage après analyse avec de l'hypochlorite de sodium)

- Laver après chaque analyse, au plus tard le lendemain de l'analyse.
- Le lavage peut également être effectué avant de commencer une analyse.
- Durée du lavage : environ 20 minutes
- Préparer d'abord le liquide de lavage Tween 20 à 0,5 % de la manière habituelle.
- Préparer du NaOCl frais (au réfrigérateur dans un petit flacon brun) :

ajouter 36 µl de NaOCl à 5 % + 864 µl de H₂O (solution 1:25). ajouter 50 µl de solution NaOCl 1:25 + 950 µl de H₂O dans un tube Miseq séparé.

- Remplir normalement les autres puits de la cartouche de lavage, mettre le tube rempli de NaOCl dans le trou numéro 17.
- Sélectionner « Post-Run Wash » (Lavage après analyse) comme d'habitude, mais cocher « Perform optional template line Wash » (Exécuter un lavage de la ligne des modèles facultatif).

LAVAGE D'ENTRETIEN

- Laver environ tous les 30 jours (calendrier joint au journal d'utilisation).
- Durée du lavage environ 60 min (étapes de lavage 3 x 20 min). Cela nécessite 3 x 500 ml de solution de lavage. Préparer toujours de nouvelles solutions de lavage à chaque étape.
- Pendant le lavage d'entretien, effacer les fichiers de sauvegarde de l'ordinateur des dossiers D:\Illumina\MiSeq analysis et D:\Illumina\MiSeq Output de manière à ce que (au moins) les fichiers du mois en cours restent dans le dossier. La taille du dossier de fichiers d'une analyse est d'environ 15 Go. Vider également la corbeille de l'ordinateur.

LAVAGE D'ATTENTE

- Si le dispositif n'est pas utilisé pendant ≥ 7 jours, un lavage d'attente est effectué.
- Durée du lavage environ 120 min (2 x 60 min). Cela nécessite 2 x 500 ml de solution de lavage.

Lorsque le dispositif est utilisé après la phase d'attente, un lavage d'entretien doit être effectué avant toute analyse.