

Détection des astrovirus par RT-PCR en temps réel

OBJET

Détection qualitative des astrovirus humains par amplification de la région ORF1a de l'astrovirus.

DOCUMENTS DE REFERENCE

N.M. van Maarseveen et al. "Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays" Journal of Clinical Virology 2010;49:205-210.

TYPES D'ÉCHANTILLON

ARN extrait sur automate d'extraction NucliSENS® EasyMAG™ de Biomérieux.

Un volume de 50 µL de culture de phage MS2 est ajouté aux échantillons et aux témoins avant extraction afin de contrôler l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs.

REACTIFS

- Taqman Fast Virus 1-Step Master mix – Thermo Fisher Scientific *réf 4444432*
- Culture de phage MS2 : contrôle d'extraction et d'inhibition

- Amorces :

Cible	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Astrovirus	ASTVs	TCT YAT AGA CCG YAT TAT TGG	2209-2229 ¹	+
	ASTVas	TCA AAT TCT ACA TCA TCA CCA A	2322-2301 ¹	-
Phage	MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCACG	289-314 ²	+
	MS2-R	GTACGGGCGACCCACGATGAC	387-366 ²	-

- Sondes :

Cible	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Astrovirus	ASTV-TQ	FAM-CCC CAD CCA TCA TCA TCT TCA TCA-QSY	2295-2272 ¹	-
Phage	MS2-P	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY	330-358 ²	+

¹ position sur le génome Astrovirus NC001943

² position sur le génome phage MS2 ATCC 15597-b1™

MODE OPERATOIRE

1. Mélange réactionnel

	Volume en µL	Concentration finale
H ₂ O	4,7	
Taqman Fast Virus 1-Step Master mix (4X)	5	1X
ASTVs (10 µM)	1,8	900 nM
ASTVas (10 µM)	1,8	900 nM
ASTV-TQ (10 µM)	0,9	450 nM
MS2-F (10 µM)	0,2	100 nM
MS2-R (10 µM)	0,2	100 nM
MS2-P (10 µM)	0,4	200 nM
Volume total de réactifs	15	

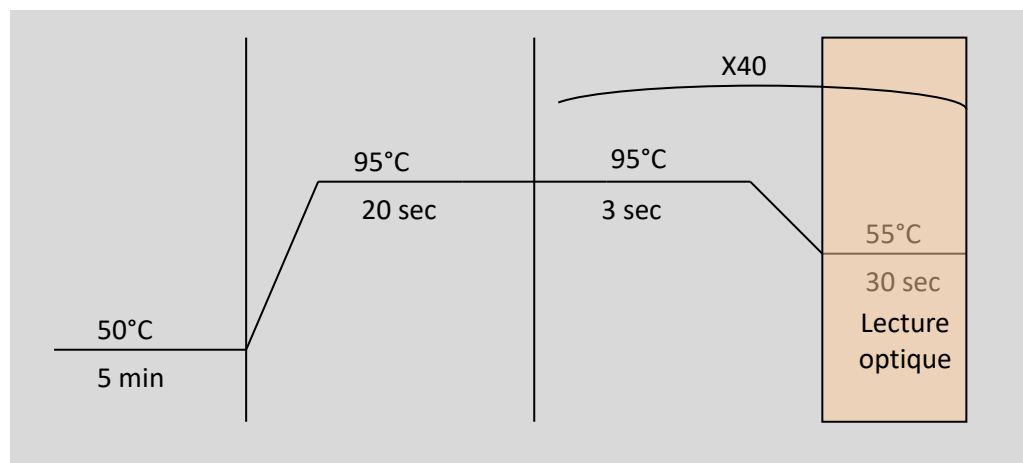
Déposer 15 µL de mélange réactionnel par puits.

2. Dépôt des acides nucléiques

Pour chaque série de temps réel, sont déposés dans des puits différents :

- 5µL d'ARN extrait pour chaque échantillon,
- 5µL de témoin négatif (PBS) extrait correspondant à la série d'extraction,
- 5µL de témoin positif.

3. Cycle d'amplification



- Reporter échantillon : FAM
- Reporter contrôle interne : VIC
- Quencher échantillon : TAMRA

- Quencher contrôle interne : QSY
- Référence passive : ROX
- Auto baseline

4. Validation analytique des résultats

Pour valider l'expérience, toutes les conditions énumérées ci-dessous doivent être impérativement remplies. Dans le cas contraire, l'ensemble de l'expérience doit être réitéré.

- Le contrôle négatif d'extraction et d'inhibition doit avoir un Ct calculé en VIC (560 nm) et un Ct non calculé en FAM (530 nm).
- Le contrôle positif d'amplification doit donner un Ct calculé en FAM (530 nm).

5. Interprétation des résultats

Contrôle d'extraction et d'inhibition 560 nm	Ct[MS2] calculé		Ct[MS2] non calculé	
	Echantillon NON INHIBÉ et correctement extrait		Echantillon INHIBÉ et/ou mal extrait	
Détection astrovirus 530 nm	Ct calculé	Ct non calculé	Ct calculé	Ct non calculé
	Résultat validé. Echantillon POSITIF	Résultat validé. Echantillon NEGATIF	Résultat validé. Echantillon POSITIF	RESULTAT non validé. L'échantillon doit être ré-extrait et passé pur et dilué au 10ème