

Détection des norovirus par RT-PCR en temps réel

OBJET

Détection qualitative des norovirus humains des génogroupes I et II par amplification en temps réel d'un fragment de gène à la jonction ORF1-ORF2, sur l'ARN extrait à partir de l'échantillon.

DOCUMENTS DE REFERENCE

- 1- Kageyama T., et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(4):1548-1557
- 2- Jothikumar N., et al. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using taqman based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. App. Environ. Microbiol. 2005;71(4): 1870-1875
- 3- Loisy F., et al. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. J. Virol. Methods 2005; 123 :1-7
- 4- Lyman W.H., et al. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. J. Pediatr. 2009;154(2):253-257
- 5- Skrabber S., et al. Simultaneous concentration of enteric viruses and protozoan parasites: a protocol based on tangential flow filtration and adapted to large volumes of surface and drinking waters. Food Environ. Virol. 2009 ;1 :66-76
- 6- Rolfe K.J., et al. An internally controlled, one step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping. Journal of clinical Virology 2007;39:318-321

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 :

	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Génogroupe I	JJV1NF ^{4,5} :	CCA TGT TCC GTT GGA TGC	5283-5300 ^a	+
	JJV1R ^{2,4,5} :	TCC TTA GAC GCC ATC ATC AT	5377-5358 ^a	-
Génogroupe II	QNIF2d ³ :	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	5012-5037 ^b	+
	COG2R ^{1,3} :	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5080-5100 ^b	-
Contrôle interne	MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCACG	289-314 ^c	+
	MS2-R	GTACGGGCGACCCACGATGAC	387-366 ^c	-

- Sondes :

	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Génogroupe I	JJV1P ^{2,4,5} :	ABY-TGT GGA CAG GAG ATC GCA ATC TC -QSY	5319-5341 ^a	+
	RING-1b ^{1,4,5} :	ABY-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-QSY	5321-5340 ^a	-
Génogroupe II	QNIFS ³ :	FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG -QSY	5042-5061 ^b	+
Contrôle interne	MS2-P	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY	330-358 ^c	+

^a position sur le génome Norwalk/68 (n° d'accèsion GenBank M87661).

^b position sur le génome Camberwell (n° d'accèsion GenBank AF145896).

^c position sur le génome phage MS2 ATCC 15597-b1™

MODE OPERATOIRE

1. Mélange réactionnel

	Volume en µL	Concentration finale
Taqman Fast Virus 1-Step Master mix (4X)	5	1X
JJV1NF (10µM)	2	1000 nM
JJV1R (10µM)	2	1000 nM
JJV1P (10µM)	0,2	100 nM
RING-1b (10µM)	0,2	100 nM
QNIF2d (20µM)	0,4	400 nM
Cog2R (20µM)	0,4	400 nM
QNIFs (7.5µM)	0,4	150 nM
MS2-F (10µM)	0,2	100 nM
MS2-R (10µM)	0,2	100 nM
MS2-P (10µM)	0,4	200nM
H ₂ O	3,6	
Volume total de réactifs	15	

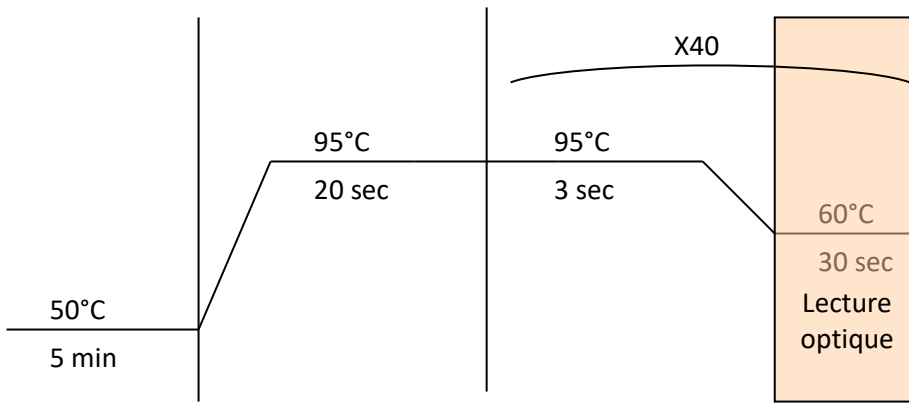
Déposer 15 µL de mélange réactionnel par puits.

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 : ABY pour GI - FAM pour GII
- Reporter contrôle interne : VIC
- Quencher échantillon : QSY
- Quencher contrôle interne: QSY
- Passive référence : 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) et ABY (583 nm).
- Le contrôle positif d'amplification doit donner un Ct calculé en FAM (530 nm) et ABY (583 nm).

5. Interprétation des résultats

contrôle d'extraction et d'inhibition 560 nm	Ct [MS2] calculé		Ct [MS2] non calculé	
		Echantillon NON INHIBE et correctement extrait		Echantillon INHIBE et/ou mal extrait
détection norovirus 530 nm (GII) 583 nm (GI)	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