

Détection des sapovirus par RT-PCR en temps réel

OBJET

Détection qualitative des sapovirus humains par amplification d'un fragment du gène codant pour la polymérase.

DOCUMENTS DE REFERENCE

Oka T. et al. (2006) J. Med. Virol. 78 : 1347-1353

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'ECHANTILLON

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
Sapovirus	SaV124F	GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC	5078-5098 ^a	+
	SaV1F	TTG GCC CTC GCC ACC TAC	700-717 ^b	+
	SaV1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	5163-5181 ^a	-
Contrôle interne	MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCACG	289-314 ^c	+
	MS2-R	GTACGGGCGACCCCACGATGAC	387-366 ^c	-

- Sondes :

Cible	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Sapovirus	SaV124TP	FAM-CCR CCT ATR AAC CA-MGB	5105-5118 ^a	-
Contrôle interne	MS2-P	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY	330-358 ^c	+

^a position sur le génome de la souche GII Mc10 (n° accession GenBank AY237420).

^b position sur le génome de la souche GI Parkville (n° accession GenBank U73124).

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

MODE OPERATOIRE

1. Mélange réactionnel

	Volume en μL	Concentration finale
H ₂ O	6	
Taqman Fast Virus 1-Step Master mix (4X)	5	1X
SaV1F (10 μM)	0,8	400 nM
SaV1245R (10 μM)	0,8	400 nM
SaV124F (10 μM)	0,8	400 nM
SaV124TP (10 μM)	0,8	400 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	

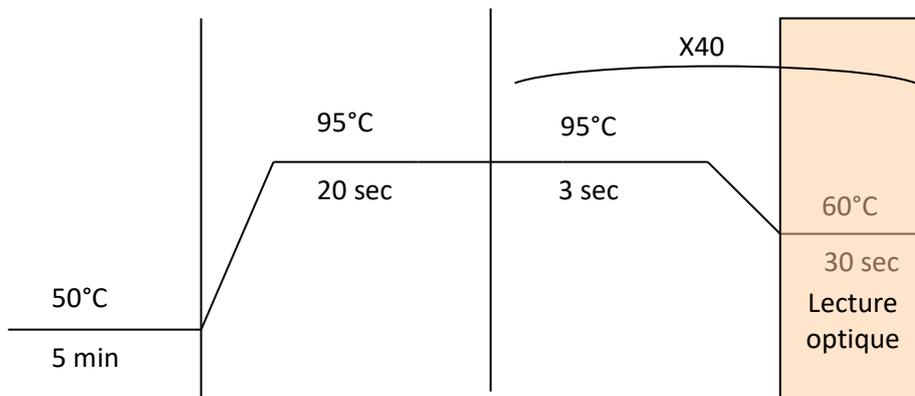
Déposer 15 μL de mélange réactionnel par puits.

2. Dépôt des acides nucléiques

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

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

3. Cycle d'amplification



- Reporter échantillon : FAM
- Reporter contrôle interne : VIC
- Quencher échantillon : NFQ-MGB
- 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).
- 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 INHIBE et correctement extrait	Echantillon INHIBE et/ou mal extrait		
Détection sapovirus 530 nm	Ct calculé	Ct non calculé	Ct calculé	Ct non calculé
	Résultat validé. Echantillon POSITIF	Résultat validé. Echantillon NEGATIF	Résultat validé. Echantillon POSITIF	Résultat validé. Echantillon NEGATIF