

Détection des virus Aichi par RT-PCR en temps réel

OBJET

Détection qualitative des virus Aichi humains par amplification de la région non-codante 5'UTR.

DOCUMENT DE REFERENCE

Nielsen et al. « Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus and salivirus in young children » J. Clin. Virol. 2013, 57, 239- 242

REACTIFS UTILISÉS

- Kit Taqman Fast Virus 1-step Master mix
- Culture de phage MS2 : virus ARN de contrôle d'extraction et d'amplification
- H₂O pour PCR

AMORCES ET SONDÉS UTILISÉES

Cible	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Virus Aichi	AichiV-F	CCCAGTGTGCGTAACCTTCT	510-529 ¹	+
	AichiV-R	GTACCTGCCTGGCATYCCTA	616-635 ¹	-
	AichiV-P	ABY-ACG CCC TGT GCG GGA TGA AA-QSY	584-603 ¹	+
Contrôle interne	MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTAC	289-314 ²	+
	MS2-R	GTACGGGCGACCCACGATGAC	387-366 ²	-
	MS2-P	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY	330-358 ²	+

¹ position sur la souche de référence AB010145

² position sur le génome phage MS2 ATCC 15597-b1TM

MODE OPERATOIRE

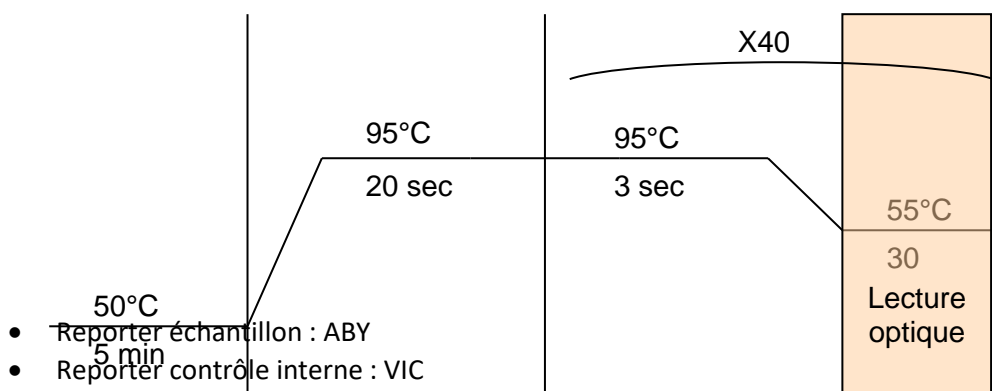
1. Extraction de l'ARN viral

L'extraction est réalisée sur automate NucliSENS® EasyMAG™ de bioMérieux.

2. Mélange réactionnel

	Volume en µL	Concentration finale
Fast 1-Step Mix (4X)	5	
AichiV-F (10µM)	2	1000nM
AichiV-R (10µM)	2	1000nM
AichiV-P (10µM)	0,4	200nM
MS2-F (10µM)	0,2	100nM
MS2-R (10µM)	0,2	100nM
MS2-P (10µM)	0,4	200nM
H ₂ O	4,8	

3. Cycle d'amplification



- Quencher échantillon : QSY
- Quencher contrôle interne: QSY
- Passive référence : ROX
- Auto baseline

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 (554 nm) et un Ct non calculé en ABY (583 nm)
- Le témoin positif doit donner un Ct calculé en ABY (583 nm).

4. Résultats

Contrôle d'extraction et d'inhibition	CT[MS2] calculé		CT[MS2] non calculé	
	échantillon NON INHIBÉ et correctement extrait		échantillon INHIBÉ et/ou mal extrait	
échantillon	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
Détection Virus Aichi	échantillon validé POSITIF	échantillon validé NÉGATIF	échantillon validé POSITIF	NÉGATIVITÉ non validée l'échantillon doit être ré-extrait