

# Détection des astrovirus par RT-PCR en temps réel

## OBJET

Détection qualitative des astrovirus humains par amplification de l'extrémité 3' du génome des Astrovirus.

## DOCUMENTS DE REFERENCE

1. Le Cann P. et al., (2004) *Res.Microbiol. Jan-Feb; 155(1):11-15. Quantification of human Astrovirus in sewage using real-time PCR.*
2. 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*
3. *Manuel de l'utilisateur (User Guide) Life Technologies Réf : 4453800 Rev.C*

## CONTENU

- Type d'échantillon
- Réactifs utilisés
- Mode opératoire

## TYPE D'ÉCHANTILLON

ARN extrait sur automate NucliSENS® EasyMAG™ de BioMérieux (Cf [FI-2015-0035](#) « Prétraitement des échantillons biologiques avant extraction des acides nucléiques sur l'automate Nuclisens Easymag (BioMérieux) » ; [NU-2015-0001](#) « Utilisation de la plate-forme Nuclisens Easymag (BioMérieux) »)

On ajoute 50 µL de culture de phage MS2 aux échantillons, au CIQ et au témoin négatif avant extraction pour contrôler l'efficacité de celle-ci et détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs.

## REACTIFS UTILISÉS

- Culture de phage MS2 : virus ARN de contrôle d'extraction et d'amplification [FI-2016-0017](#)

- Amorces

Cible	Noms	Séquences	(5'3') Positions	Sens
Astrovirus	AV1TR	CCG AGT AGG ATC GAG GGT	6775-6797 <sup>1</sup>	-
	AV2TR	GCT TCT GAT TAA ATC AAT TTT A A	6708-6725 <sup>1</sup>	+
Contrôle interne	MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCACG	289-314 <sup>2</sup>	+
	MS2-R	GTACGGGCGACCCACGATGAC	387-366 <sup>2</sup>	-

- Sondes

Cible	Noms	Séquences	(5'3') positions	Sens
Astrovirus	AVs	FAM-CTT TTC TGT CTC TGT TTA GAT TAT TTT AAT CAC C-TAMRA	6739-6772 <sup>1</sup>	+
Contrôle interne	MS2-P	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY	330-358 <sup>2</sup>	+

<sup>1</sup> positions sur le génome d'une souche d'astrovirus de type 2.

<sup>2</sup> position sur le génome phage MS2 ATCC 15597-b1TM

## MODE OPERATOIRE

### 1. Mélange réactionnel

	Concentration initiale	Volume en µL
H2O		8,52
TaqMan <sup>®</sup> fast Virus 1-Step Master Mix	4X	5
AV1TR	10 µM	0,24
AV2TR	10 µM	0,24
AVs	10 µM	0,20
MS2-F	10µM	0,20
MS2-R	10 µM	0,20
MS2-P	10µM	0,40

ARN		5
Volume final par tube		20

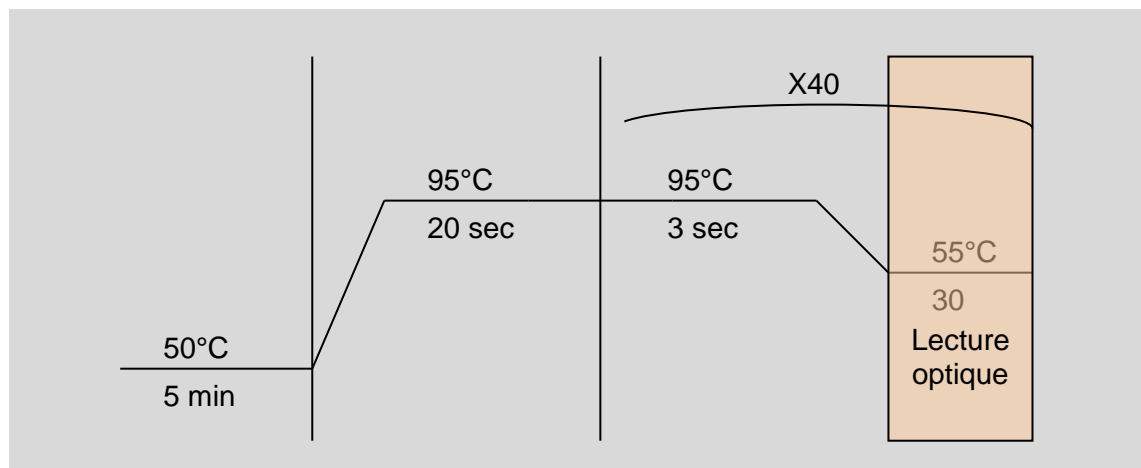
## 2. Dépôts des acides nucléiques

Pour chaque série de temps réel, déposer 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

Centrifuger brièvement la plaque ou les tubes, afin qu'il n'y ait aucune goutte sur les parois, avant de lancer la RT-PCR en temps réel.

## 3. Cycle d'amplification (Selon les recommandations de Life Technologies)



- Reporter échantillon : FAM
- Reporter contrôle interne : VIC
- Quencher échantillon : TAMRA
- 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 (554 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	CT[MS2] calculé		CT[MS2] non calculé	
	échantillon <b>NON INHIBE</b> et correctement extrait		échantillon <b>INHIBE</b> et/ou mal extrait	
échantillon	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
détection Norovirus	échantillon validé <b>POSITIF</b>	échantillon validé <b>NEGATIF</b>	échantillon validé <b>POSITIF</b>	<b>NEGATIVITE non validée</b> l'échantillon doit être ré-extrait et passé au pur et au 10ème