

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 de l'échantillon.

DOCUMENTS DE REFERENCE

1. Kageyama T., et al. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4):1548-1557
2. Jothikumar N., et al. *App. Environ. Microbiol.* 2005;71(4): 1870-1875
3. Loisy F., et al. *J. Virol. Methods* 2005; 123 :1-7
4. Lyman W.H., et al. *J. Pediatr.* 2009;154(2):253-257
5. Skraber S., et al. *Food Environ. Virol.* 2009 ;1 :66-76
6. Rolfe K.J., et al. *Journal of Clinical Virology* 2007;39:318-321
7. *Manuel de l'utilisateur (User Guide) Life Technologies Réf : 4453800 Rev.C*
8. *Dossier de validation Norovirus EN-2015-0077*

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.

RÉACTIFS UTILISÉS

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

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

- Sondes

	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Génogroupe I	JJV1P ² :	ABY-5'-TGT GGA CAG GAG ATC GCA ATC TC -3'-QSY	5319-5341 ^a	+
	RING-1b ³ :	ABY-5'-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-3'-QSY	5321-5340 ^a	-
Génogroupe II	QNIFS ⁴ :	FAM-5'-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG -3'-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-b1TM

MODE OPÉRATOIRE

1. Mélange réactionnel

Norovirus Génogroupe I et II		
	Volume en μL	Concentration finale
TaqMan [®] fast Virus, 1-Step Master Mix	5	
JJV1NF	2	1000 nM
JJV1R	2	1000 nM
JJV1P	0,2	100 nM
RING-1b	0,2	100 nM
QNIF2d	0,4	400 nM
Cog2R	0,4	400 nM
QNIFs	0,4	150 nM
MS2-F (10 μM)	0.2	100nM
MS2-R (10 μM)	0.2	100nM
MS2-P (10 μM)	0.4	200nM
H ₂ O	3.6	
Volume final par tube	15	

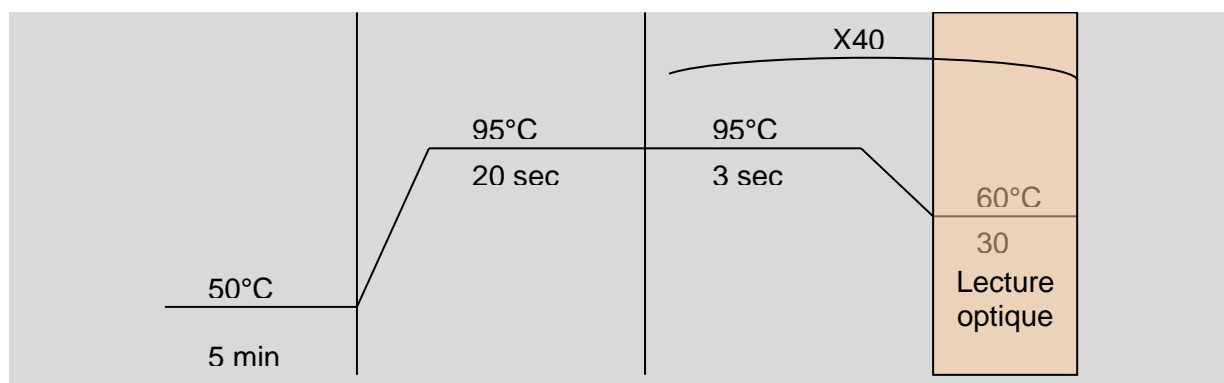
2. Dépôts des acides nucléiques :

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

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

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

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 (554 nm) et un Ct non calculé en FAM (530 nm) et ABY (583 nm).
- Le CIQ doit donner un Ct calculé en FAM (530 nm) et ABY (583 nm).

5. Interprétation des résultats :

contrôle d'extraction et d'inhibition	CT[MS2] calculé		CT[MS2] non calculé	
	échantillon NON INHIBE et correctement extrait		échantillon INHIBE et/ou mal extrait	
échantillon	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
détection Norovirus	échantillon validé POSITIF	échantillon validé NEGATIF	échantillon validé POSITIF	NEGATIVITE non validée l'échantillon doit être ré-extrait et passé au pur et au 10ème