

# Détection des rotavirus du groupe A par RT-PCR en temps réel

## OBJET

Détection des rotavirus du groupe A par amplification du gène codant pour la protéine de capsid VP2 (Viral Protein 2).

## DOCUMENTS DE REFERENCE

Gutiérrez-Aguirre I., et al. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46(8):2547-2554.

Rolfe K.J., et al. *Journal of clinical Virology* 2007;39:318-321

Manuel de l'utilisateur (User Guide) Life Technologies Réf : 4453800 Rev.C

## CONTENU

- Type d'échantillon
- Réactifs utilisés
- Mode opératoire

### TYPE D'ECHANTILLON

ARN extrait sur automate NucliSENS® EasyMAG™ de BioMérieux

On ajoute 50 µL de culture de phage MS2, aux échantillons, au CIQ et au témoin négatif avant extraction afin de contrôler l'efficacité de l'extraction et de 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 utilisées

Cible	Nom	Sens	Longueur	Séquence 5'→3'
Rotavirus A (VP2)	VP2-F1	Sens	24	TCTGCAGACAGTTGAACCTATTAA
	VP2-F2	Sens	22	CAGACACGGTTGAACCCATTAA
	VP2-F3	Sens	28	TCGGCTGATACAGTAGAACCTATAAATG
	VP2-F4	Sens	30	TGTCAGCTGATACAGTAGAACCTATAAATG
	VP2-F5	Sens	28	TCAGCTGACACAGTAGAACCTATAAATG
	VP2-R1	Anti-sens	23	GTTGGCGTTTACAGTTCGTTTCAT
	VP2-R2	Anti-sens	23	GTTGGCGTCTACAATTCGTTTCAT
	VP2-P	Sens	22	6FAM-ATGCGCATRTRTCAAHGCCAA
Contrôle interne	MS2-F	Sens	26	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCACG
	MS2-R	Anti-sens	22	GTACGGGCGACCCACGATGAC

#### Sondes utilisées

Cible	Nom	Sens	Longueur	Séquence 5'→3'
Rotavirus A (VP2)	VP2-P	Sens	22	6FAM-ATGCGCATRTRTCAAHGCCAA
Contrôle interne	MS2-P	Sens	29	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY

- Gamme d'étalonnage pour quantification : 10 dilutions (10<sup>9</sup> à 10<sup>0</sup> copies/µL) d'un plasmide contenant le segment de gène partiel codant la VP2 des rotavirus du groupe A ([FI-2016-0036](#))

## MODE OPÉRATEUR

### 1. Mélange réactionnel :

	Volume en $\mu\text{L}$	Concentration finale
TaqMan® fast Virus 1-Step Master Mix	5	
VP2-F1 (100 $\mu\text{M}$ )	0.18	900nM
VP2-F2 (100 $\mu\text{M}$ )	0.18	900nM
VP2-F3 (100 $\mu\text{M}$ )	0.18	900nM
VP2-F4 (100 $\mu\text{M}$ )	0.18	900nM
VP2-F5 (100 $\mu\text{M}$ )	0.18	900nM
VP2-R1 (40 $\mu\text{M}$ )	0.45	900nM
VP2-R2 (40 $\mu\text{M}$ )	0.45	900nM
VP2-P (10 $\mu\text{M}$ )	0.5	250nM
MS2-F (10 $\mu\text{M}$ )	0.2	100nM
MS2-R (10 $\mu\text{M}$ )	0.2	100nM
MS2-P (10 $\mu\text{M}$ )	0.4	200nM
H <sub>2</sub> O	2.9	
<i>Volume réactifs</i>	<i>11</i>	
<i>Volume ARN dénaturés</i>	<i>9</i>	
<i>Volume final par tube</i>	<i>20</i>	

Déposer 4  $\mu\text{L}$  d'eau par puits pour effectuer la dénaturation en pièce d'extraction

### 2. Dépôts des acides nucléiques:

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

- 5 $\mu\text{L}$  d'ARN extrait pour chaque échantillon
- 5 $\mu\text{L}$  de témoin négatif (PBS) extrait correspondant à la série d'extraction
- 5 $\mu\text{L}$  de CIQ extrait correspondant à la série d'extraction
- dans le cas d'un essai quantitatif, prévoir 20 puits pour réaliser la gamme d'étalonnage en double, mais ajouter l'ADN plasmidique seulement après l'étape de dénaturation

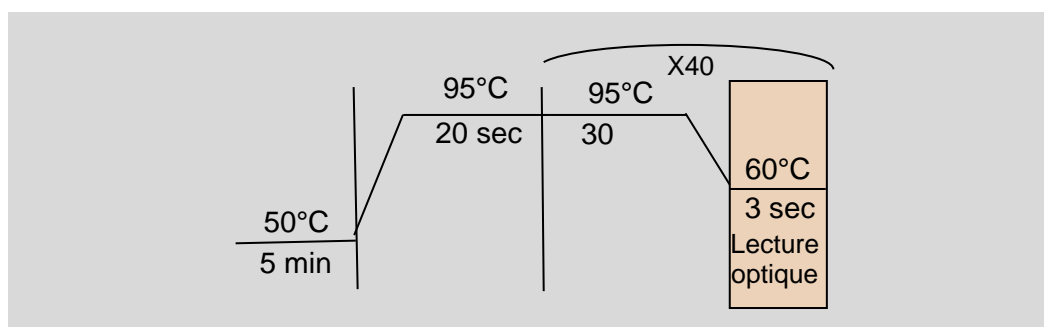
Lancer ensuite la dénaturation : 5 minutes à 97°C dans un thermocycleur, puis plonger immédiatement les échantillons dans la glace.

Après 2 minutes, ajouter 11  $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel.

Dans le cas d'un essai quantitatif, ajouter 5 $\mu\text{L}$  d'ADN pour chaque point de la gamme d'étalonnage (réalisée en double).

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



- 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 (554 nm) et un Ct non calculé en FAM (530 nm).
- Le CIQ 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 Rotavirus	échantillon validé <b>POSITIF</b>	échantillon validé <b>NEGATIF</b>	échantillon validé <b>POSITIF</b>	<b>NEGATIVITE non validée</b> l'ARN de l'échantillon doit être ré-extrait

Lors d'un essai quantitatif, le logiciel « 7500 System SDS v 2.0.6 » indique automatiquement le nombre de copies de génome viral par essai. Il est alors possible de convertir cette valeur en nombre de copies de génome viral par gramme de selles en prenant en compte les volumes d'élution et de surnageant ainsi que le poids des matières fécales utilisés au cours de l'extraction des acides nucléiques.

Dans le cadre de l'activité de diagnostic des infections à rotavirus réalisée au CNR, les résultats sont rendus dans le cahier des « Externes » en cours, puis dans les feuilles de travail correspondant aux échantillons. Dans le cadre de la surveillance multicentrique des souches de rotavirus réalisée par le CNR, les résultats sont rendus dans le cahier « Rotavirus » en cours et dans la base de données Excel « Surveillance RVA ».