

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.

DOCUMENT DE REFERENCE

1. Oka T. et al. (2006) *J. Med. Virol.* 78 : 1347-1353
2. Rolfe K.J., et al. *Journal of clinical Virology* 2007;39:318-321
3. *Manuel de l'utilisateur (User Guide) Life Technologies Réf : 4453800 Rev.C*

TYPE D'ÉCHANTILLON

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 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
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	-
MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTACAG	289-314 ^c	+
MS2-R	GTACGGGCGACCCACGATGAC	387-366 ^c	-

- **Sonde** :

Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
SaV124TP	FAM-CCR CCT ATR AAC CA-MGB	5105-5118 ^a	-
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-b1T

MODE OPÉRATOIRE

1. Mélange réactionnel

	Concentration initiale	Volume en µL
H ₂ O		6
TaqMan® fast Virus, 1-Step Master Mix	4x	5
SaV1F	10 µM	0,8
SaV1245R	10 µM	0,8
SaV124F	10 µM	0,8
SaV124TP sonde	1 µM	0,8
MS2-F	10µM	0,2
MS2-R	10 µM	0,2
MS2-P	10µM	0,4
ARN		5
Volume final par tube		20

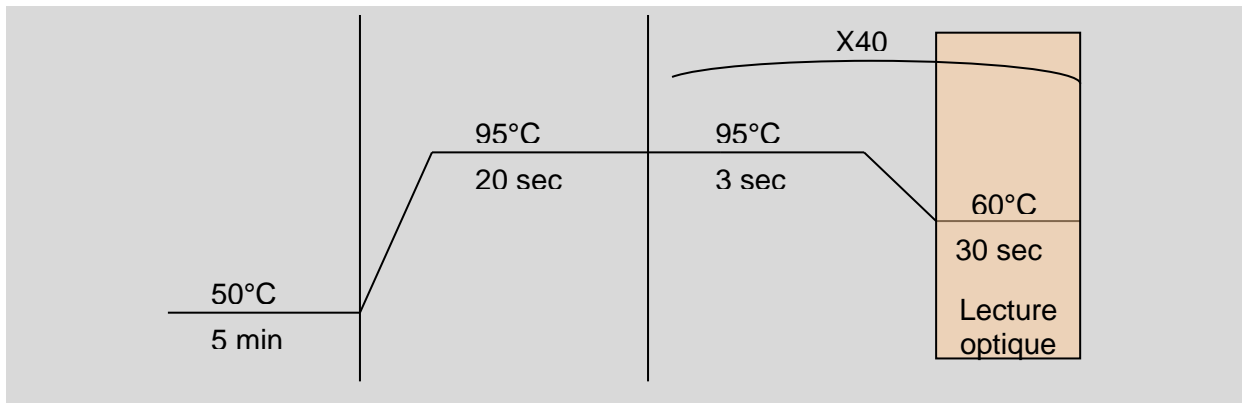
2. Dépôts des acides nucléiques

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 :



- 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 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 NON INHIBE et correctement extrait		échantillon INHIBE et/ou mal extrait	
échantillon	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
détection Sapovirus	échantillon validé POSITIF	échantillon validé NEGATIF	échantillon validé POSITIF	NEGATIVITE non validée l'échantillon doit être ré-extrait