

## 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

### DOCUMENTS 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

### TYPES D'ECHANTILLON

ARN extrait sur automate d'extraction NucliSENS® EasyMAG™ de Biomérieux.

Un volume de 50 µL de culture de phage MS2 est ajouté aux échantillons et aux témoins avant extraction afin de contrôler l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs.

### REACTIFS

- Taqman Fast Virus 1-Step Master mix – Thermo Fisher Scientific *réf 4444432*
- Culture de phage MS2 : contrôle d'extraction et d'inhibition
- Amorces :

Cible	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Virus Aichi	AichiV-F	CCCAGTGTGCGTAACCTTCT	510-529 <sup>1</sup>	+
	AichiV-R	GTACCTGCCTGGCATYCCTA	616-635 <sup>1</sup>	-
Phage	MS2-F	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTAC	289-314 <sup>2</sup>	+
	MS2-R	GTACGGGCGACCCCACGATGAC	387-366 <sup>2</sup>	-

- Sondes :

Cible	Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
Virus Aichi	AichiV-P	ABY-ACG CCC TGT GCG GGA TGA AA-QSY	584-603 <sup>1</sup>	+
Phage	MS2-P	VIC-CACATCGATAGATCAAGGTGCCTACAAGC-QSY	330-358 <sup>2</sup>	+

<sup>1</sup> position sur la souche de référence AB010145

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

## MODE OPERATOIRE

### 1. Mélange réactionnel

	Volume en $\mu\text{L}$	Concentration finale
H2O	4,8	
Taqman Fast Virus 1-Step Master mix (4X)	5	1X
AichiV-F (10 $\mu\text{M}$ )	2	1000 nM
AichiV-R (10 $\mu\text{M}$ )	2	1000 nM
AichiV-P (10 $\mu\text{M}$ )	0,4	200 nM
MS2-F (10 $\mu\text{M}$ )	0,2	100 nM
MS2-R (10 $\mu\text{M}$ )	0,2	100 nM
MS2-P (10 $\mu\text{M}$ )	0,4	200 nM
Volume total de réactifs	15	

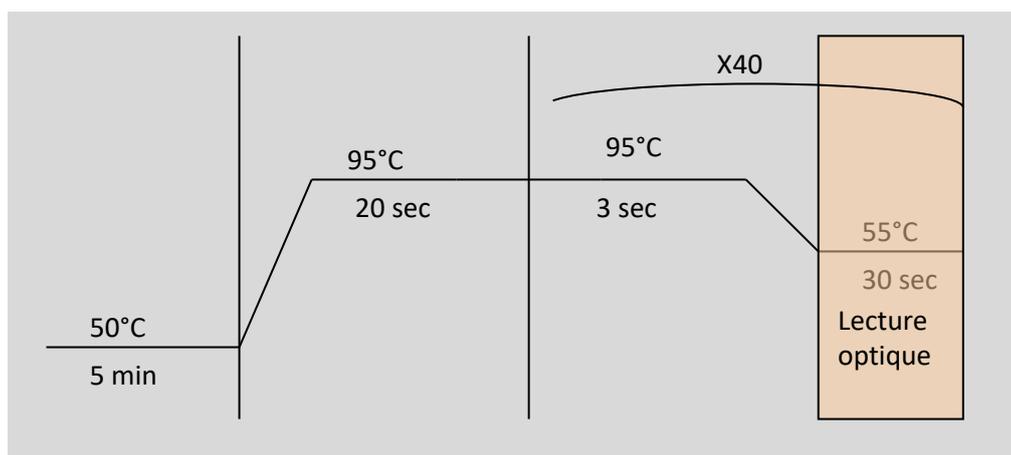
Déposer 15  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel par puits.

### 2. Dépôt des acides nucléiques

Pour chaque série de temps réel, sont déposés 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 témoin positif

### 3. Cycle d'amplification



- Reporter échantillon : ABY
- Reporter contrôle interne : VIC
- Quencher échantillon : QSY

- Quencher contrôle interne: QSY
- Référence passive : 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 (560 nm) et un Ct non calculé en ABY (583 nm)
- Le témoin positif doit donner un Ct calculé en ABY (583 nm).

#### 5. Interprétation des résultats

Contrôle d'extraction et d'inhibition 560 nm	Ct [MS2] calculé		Ct [MS2] non calculé	
	Echantillon <b>NON INHIBÉ</b> et correctement extrait	Echantillon <b>INHIBÉ</b> et/ou mal extrait		
Détection Virus Aichi 583 nm	Ct calculé	Ct non calculé	Ct calculé	Ct non calculé
	Résultat validé. Echantillon <b>POSITIF</b>	Résultat validé. Echantillon <b>NEGATIF</b>	Résultat validé. Echantillon <b>POSITIF</b>	<b>RESULTAT non validé.</b> L'échantillon doit être ré-extrait et passé pur et dilué au 10ème