

Détection des rotavirus par RT-PCR en temps réel

OBJET

Détection et quantification (charge virale) 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.* Sensitive detection of multiple rotavirus genotypes with a single reverse transcription-real-time quantitative PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46(8):2547-2554.

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

TYPES D'ÉCHANTILLON

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*
- Phage MS2 : [BMS 8930](#) « Production et titrage du bactériophage ARN F-spécifique MS2 »
- Amorces :

Cible	Nom	Sens	Longueur	Séquence 5'3'
Rotavirus A (VP2)	VP2-F1	Sens	24	TCTGCAGACAGTTGAACCTATTAA
	VP2-F2	Sens	22	CAGACACGGTTGAACCCATTAA
	VP2-F3	Sens	28	TCGGCTGATACAGTAGAACCTATAAAATG
	VP2-F4	Sens	30	TGTCAGCTGATACAGTAGAACCTATAAAATG
	VP2-F5	Sens	28	TCAGCTGACACAGTAGAACCTATAAAATG
	VP2-R1	Anti-sens	23	GTTGGCGTTTACAGTTCGTTTCAT
	VP2-R2	Anti-sens	23	GTTGGCGTCTACAATTCGTTTCAT
Contrôle interne	MS2-F	Sens	26	TGGCACTACCCCTCTCCGTATTCACG
	MS2-R	Anti-sens	22	GTACGGGCGACCCACGATGAC

- Sondes :

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

Gamme d'étalonnage pour quantification : 10 dilutions (10^9 à 10^0 copies/ μL) d'un plasmide contenant le segment de gène partiel codant la VP2 des rotavirus du groupe A

MODE OPERATOIRE

1. Mélange réactionnel

	Volume en μL	Concentration finale
Taqman Fast Virus 1-Step Master mix (4X)	5	1X
VP2-F1 (100 μM)	0.18	900nM
VP2-F2 (100 μM)	0.18	900nM
VP2-F3 (100 μM)	0.18	900nM
VP2-F4 (100 μM)	0.18	900nM
VP2-F5 (100 μM)	0.18	900nM
VP2-R1 (40 μM)	0.45	900nM
VP2-R2 (40 μM)	0.45	900nM
VP2-P (10 μM)	0.5	250nM
MS2-F (10 μM)	0.2	100nM
MS2-R (10 μM)	0.2	100nM
MS2-P (10 μM)	0.4	200nM
H ₂ O	2.9	
Volume total de réactifs	11	
Volume ARN dénaturés	9	
Volume final par tube	20	

Déposer 4 μL d'eau par puits pour effectuer la dénaturation en pièce d'extraction.

2. Dépôt des acides nucléiques

Pour chaque série de temps réel, sont déposés 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 témoin positif
- 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

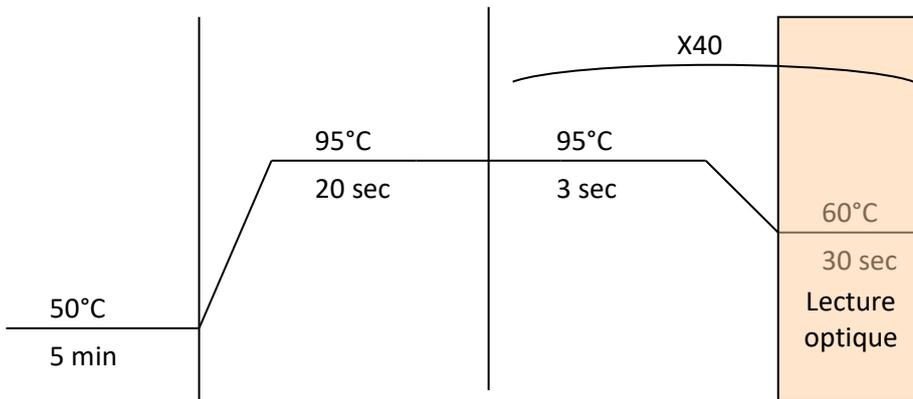
Lancer ensuite la dénaturation : 5 minutes à 97°C dans un thermocycleur, puis plonger immédiatement les échantillons dans la glace.

Après 2 minutes, ajouter 11 μL du mélange réactionnel.

Dans le cas d'un essai quantitatif, ajouter 5 μL 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 (560 nm) et un Ct non calculé en FAM (530 nm).
- Le contrôle positif doit donner un Ct calculé en FAM (530 nm).

5. Interprétation des résultats

Contrôle d'extraction et d'inhibition 560 nm	Ct [MS2] calculé		Ct [MS2] non calculé	
	Echantillon NON INHIBE et correctement extrait		Echantillon INHIBE et/ou mal extrait	
Détection Rotavirus 530 nm	Ct calculé	Ct non calculé	Ct calculé	Ct non calculé
	Résultat validé. Echantillon POSITIF	Résultat validé. Echantillon NEGATIF	Résultat validé. Echantillon POSITIF	RESULTAT non validé. L'échantillon doit être ré-extrait et passé pur et dilué au 10ème

Lors d'un essai quantitatif, le logiciel « QuantStudio™ Design & Analysis Software » 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 utilisées au cours de l'extraction des acides nucléiques.