

Détection des adénovirus par PCR en temps réel

OBJET

Détection qualitative et quantitative des adénovirus humains par amplification d'un fragment du gène Hexon codant pour les capsomères hexagonaux, formant les sous unités de la capsidie protéique des adénovirus. La trousse ADENOVIRUS R-gene™ permet de détecter et de mesurer la charge virale par amplification en temps réel après extraction de l'ADN viral.

DOCUMENT DE REFERENCE

Notice de la trousse ADENOVIRUS R-gene™ (Argene)

CONTENU

- Réactifs utilisés
- Mode opératoire

DEFINITION

- **PCR** : Polymerisation Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

RÉACTIFS UTILISÉS

ADENOVIRUS R-gene™ - Trousse de quantification. Argene. Réf: 69-010-B

Contenu de la trousse :

- W0 : Eau qualité PCR
- IC2 : Contrôle interne 2
- R0 : Eau pour amplification
- QS1 : Standard de quantification à 5000 copies/ μL * d'adénovirus
- QS2 : Standard de quantification à 500 copies/ μL * d'adénovirus
- QS3 : Standard de quantification à 50 copies/ μL * d'adénovirus
- QS4 : Standard de quantification à 5 copies/ μL * d'adénovirus
- SC : Contrôle de sensibilité à 1 copie / μL *
- R10 : Prémix d'amplification pour adénovirus et IC2

** correspond au nombre de copies de plasmide pour adénovirus*

MODE OPERATOIRE

1. Extraction de l'ADN viral

L'extraction est réalisée sur automate NucliSENS® EasyMAG™ de bioMérieux.

Un contrôle interne (IC2 10 μL) est ajouté aux échantillons et au témoin négatif avant l'extraction pour contrôler l'efficacité de l'extraction et de détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs.

2. Mélange réactionnel

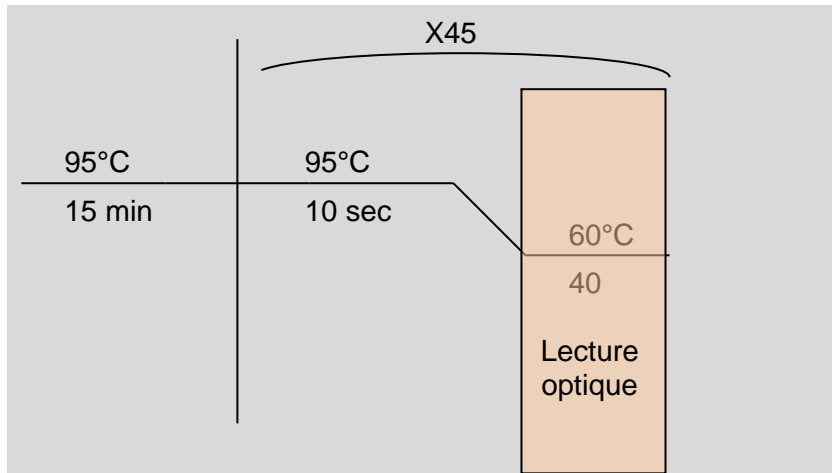
- Distribuer 15 μL de R10 dans chaque tube.
- Déposer 10 μL d'échantillon, ou 10 μL de contrôle de sensibilité (SC), ou 10 μL de standard (QS4 au QS1), ou 10 μL de témoin négatif ou 10 μL de témoin positif.

Remarque :

➤ Le contrôle de sensibilité équivaut à un échantillon faiblement positif. Pour cette raison, il est testé systématiquement et pourra occasionnellement sortir négatif.

➤ Une gamme composée de 4 points (QS1, **QS2**, QS3 et QS4), compris entre 5000 et 5 copies par μL d'ADN standard – soit 50 000 à 50 copies par amplification – permet de tracer la courbe standard à partir de laquelle les échantillons seront quantifiés.

3. Cycle d'amplification



- Reporter échantillon : FAM
- Reporter contrôle IC2 : VIC
- Quencher échantillon et contrôle IC2 : NFQ-MGB
- Auto baseline
- Passive reference : None

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'amplification ne doit donner aucun signal à 530 nm (FAM) et un signal inférieur ou égal à 36 cycles à 560 nm (VIC).
- Le contrôle positif d'amplification doit donner un signal compris entre 18 et 25 cycles à 530 nm (FAM).
- La pente requise pour la gamme standard doit être comprise entre $-3.971 < \text{Pente} < -3.103$ (valeurs données par Argene)

5. Interprétation des résultats :

contrôle d'extraction et d'inhibition	CT [IC2sample] ≤ CT[IC2PBS] + 3 cycles		CT [IC2sample] ≥ CT[IC2PBS] + 3 cycles	
	échantillon NON INHIBÉ et correctement extrait		échantillon INHIBÉ et/ou mal extrait	
échantillon	CT calculé	CT non calculé	CT calculé	CT non calculé
détection Adénovirus	échantillon validé POSITIF	échantillon validé NEGATIF	échantillon validé POSITIF	NEGATIVITÉ non validée l'échantillon doit être ré-extrait