

# DÉTECTION DES ADÉNOVIRUS PAR RT-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.

## DOCUMENTS DE REFERENCE

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

## TYPES D'ÉCHANTILLON

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

Un volume de 10 µL de contrôle interne IC2, fourni dans le kit, 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

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. Mélange réactionnel

Distribuer 15 µL de R10 dans chaque puits.

### 2. Dépôt des acides nucléiques

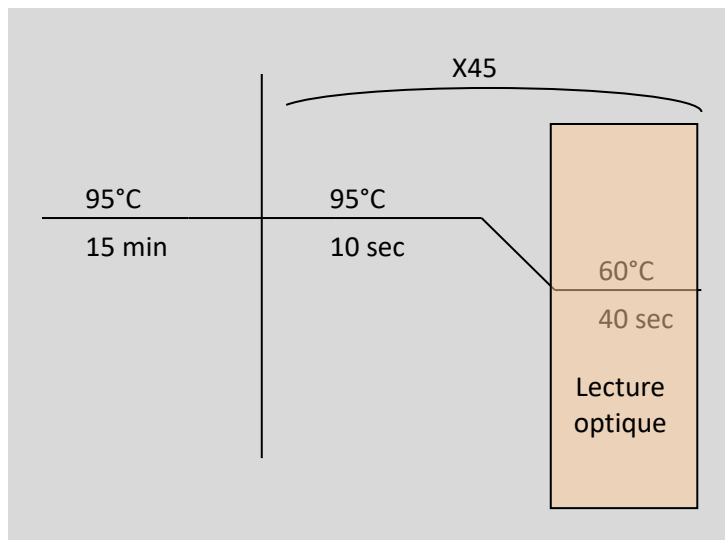
Pour chaque série de temps réel, sont déposés dans des puits différents :

- 10 µL d'ADN extrait pour chaque échantillon
- 10 µL de témoin négatif (PBS) extrait correspondant à la série d'extraction
- 10 µL de témoin positif QS3
- 10 µL de standard (QS4 au QS1) pour le quantitatif

Remarque :

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'inhibition IC2-PBS ne doit donner aucun signal à 530 nm (FAM) et un signal inférieur ou égal à 32 cycles à 560 nm (VIC).
- Le contrôle positif d'amplification QS3 doit donner un Ct calculé en FAM compris entre 29 et 33 (530 nm).
- 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 560 nm	Ct [IC2sample] ≤ Ct [IC2PBS] + 3 cycles		Ct [IC2sample] > Ct [IC2PBS] + 3 cycles	
		Echantillon <b>NON INHIBÉ</b> et correctement extrait		Echantillon <b>INHIBÉ</b> et/ou mal extrait
Détection adénovirus 530 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