

Octobre 2015

# Manuel du kit *artus*<sup>®</sup> HAdV RG PCR



Version 1  
Pour utilisation avec les appareils Rotor-  
Gene<sup>®</sup> Q

**IVD**

**CE**

**REF**



**R1 MAT**

4530265

altona Diagnostics GmbH,  
Mörkenstraße 12, 22767 Hamburg, ALLEMAGNE

1096380-FR

Distribué par QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALLEMAGNE

---

# Sommaire

Utilisation prévue.....	4
Résumé et description.....	4
Informations sur l'agent pathogène.....	4
Principe de la technique.....	6
Matériel fourni.....	7
Contenu du kit.....	7
Matériel nécessaire mais non fourni.....	7
Avertissements et précautions.....	8
Avertissements.....	8
Précautions d'emploi.....	9
Stockage et manipulation des réactifs.....	10
Composants du kit.....	10
Procédure.....	11
Extraction de l'ADN.....	11
Protocole : détection de l'ADN spécifique de l'HAdV.....	14
Interprétation des résultats.....	25
Validité du cycle.....	25
Analyse qualitative.....	26
Analyse quantitative.....	27
Limites.....	29
Contrôle de la qualité.....	29

---

Caractéristiques de performance .....	30
Sensibilité analytique .....	32
Spécificité analytique.....	33
Plage linéaire.....	35
Précision .....	36
Évaluation en diagnostic .....	37
Répétabilité .....	38
Symboles.....	40
Résolution des principaux problèmes rencontrés .....	41
Pour commander .....	42

---

# Utilisation prévue

Le kit *artus*<sup>®</sup> HAdV RG PCR (96) est un test de diagnostic *in vitro* utilisant la technologie d'amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*, PCR) en temps réel pour détecter et quantifier l'ADN spécifique de l'adénovirus humain (HAdV).

## Résumé et description

Le kit *artus* HAdV RG PCR constitue un système prêt à l'emploi pour la détection de l'ADN spécifique de l'HAdV par le biais d'une PCR en temps réel sur les appareils Rotor-Gene Q. Le dosage comporte un système d'amplification hétérologue (contrôle interne) qui permet d'identifier une possible inhibition de la PCR et de vérifier l'intégrité des réactifs du kit.

### Informations sur l'agent pathogène

Les adénovirus humains (HAdV), isolés pour la première fois à partir de tissu lymphoïde explanté dans les années 1950, sont des virus non enveloppés à double brin d'ADN de la famille *Adenoviridae* qui appartiennent au genre *Mastadenovirus*. Ils sont présents dans le monde entier et entraînent des infections dépourvues d'aspect saisonnier.

Les HAdV sont classés en sept espèces, de A à G. L'espèce B est elle-même sous-divisée en B1 et B2. Au moins 56 sérotypes différents (HAdV-1 à HAdV-56) ont été décrits à ce jour. Les adénovirus sont à l'origine d'un spectre étendu de maladies, dont les rhumes, la pharyngite, la bronchite, la pneumonie, la diarrhée, la conjonctivite (infection oculaire), la fièvre, la cystite (inflammation ou infection de la vessie), des maladies éruptives et des maladies neurologiques.

---

Les symptômes de la maladie provoquée par une espèce d'adénovirus dépendent du tropisme cellulaire privilégié par le virus. Par exemple, les maladies respiratoires sont fréquemment provoquées par l'espèce B1, C ou E, les maladies oculaires par l'espèce B, D ou E, la gastro-entérite est connue pour être généralement induite par l'espèce A, F ou G, alors que les infections rénales et urinaires sont fréquemment associées à l'HAdV de l'espèce B2.

Les caractéristiques épidémiologiques des adénovirus varient en fonction de leur type. Si certains adénovirus humains sont endémiques dans certaines parties du monde, avec des infections habituellement contractées au cours de l'enfance, d'autres types entraînent des infections sporadiques avec des flambées occasionnelles. Tous les HAdV sont transmis par contact direct, par transmission oro-fécale et parfois par l'eau contaminée.

Alors que la majorité des infections à HAdV guérissent spontanément, des pneumonies graves sont survenues de manière sporadique chez des personnes ne présentant pas d'autres problèmes de santé. En outre, certains types peuvent provoquer des infections asymptomatiques persistantes des amygdales, des végétations adénoïdes et des intestins chez les hôtes infectés, et l'excrétion virale peut durer des mois ou des années. La réactivation d'infections latentes chez des hôtes immunocompromis, tels que les receveurs de greffe, peut entraîner une maladie disséminée engageant le pronostic vital.

Les HAdV sont très résistants à différentes conditions environnementales et fortement contagieux. Des poussées nosocomiales de maladies à adénovirus, telles que la kératoconjonctivite épidémique, peuvent facilement survenir si les bonnes pratiques d'hygiène et de lutte contre les infections ne sont pas strictement respectées. Dans certains pays, la déclaration de certains cas de flambées de maladies à HAdV aux autorités locales est obligatoire.

---

# Principe de la technique

Les Masters HAdV RG Master A et HAdV RG Master B contiennent des réactifs et des enzymes permettant d'amplifier spécifiquement des régions cibles présentes dans les gènes de l'HAdV et de détecter directement le produit d'amplification spécifique dans le canal de fluorescence Cycling Green des appareils Rotor-Gene Q.

En outre, le kit *artus* HAdV RG PCR contient un système d'amplification hétérologue permettant d'identifier d'éventuels dysfonctionnements pendant le processus de dosage. Cette détection se fait à titre de contrôle interne (IC) dans le canal de fluorescence Cycling Yellow des appareils Rotor-Gene Q.

Les sondes spécifiques de l'ADN de l'HAdV sont marquées avec le fluorophore FAM™. La sonde spécifique du contrôle interne (IC) est marquée avec le fluorophore JOE™. L'utilisation de sondes marquées avec des fluorophores différenciables par analyse spectrale permet de détecter et de quantifier simultanément l'ADN spécifique de l'HAdV ainsi que de détecter le contrôle interne dans les canaux correspondants de l'appareil Rotor-Gene Q.

# Matériel fourni

## Contenu du kit

<b>artus HAdV RG PCR Kit</b>		<b>(96)</b>
<b>Référence</b>		<b>4530265</b>
<b>Nombre de réactions</b>		<b>96</b>
Bleu	HAdV RG Master A (Master A)	8 x 60 µl
Violet	HAdV RG Master B (Master B)	8 x 180 µl
Vert	HAdV RG IC (contrôle interne)	1 x 1 000 µl
Rouge	HAdV QS* (étalon de quantification)	4 x 250 µl
Blanc	H <sub>2</sub> O	1 x 500 µl
	Manuel	1

\*Le kit *artus* HAdV RG PCR contient quatre étalons de quantification (QS1–QS4).

## Matériel nécessaire mais non fourni

Avant utilisation, s'assurer que tous les instruments sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

### Réactifs

- QIAamp DNA Mini Kit (minikit QIAamp DNA) (QIAGEN, référence 51304 ou 51306 ; voir « Extraction de l'ADN », page 11)

## Consommables

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps (rangées de tubes de 0,1 ml et de bouchons), pour utilisation avec un rotor à 72 puits (QIAGEN, référence 981103 ou 981106)
- Microtubes à centrifuger exempts de nucléase, à faible fixation d'ADN pour la préparation des Masters
- Cônes de pipettes exempts de nucléase munis de barrières à aérosol

## Équipement

- Appareil Rotor-Gene Q MDx 5plex, Rotor-Gene Q 5plex ou Rotor-Gene Q 6plex
- Logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.1 ou supérieure
- Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes (bloc de chargement, 72 tubes de 0,1 ml), bloc aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels (QIAGEN, référence 9018901)
- Pipettes réglables dédiées à la préparation des échantillons
- Pipettes réglables dédiées à la préparation du Mastermix
- Pipettes réglables dédiées à la distribution de l'ADN matriciel
- Mixeur Vortex
- Centrifugeuse de paillasse avec rotor pour tubes réactionnels de 2 ml

# Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Lire attentivement toutes les instructions avant d'utiliser le test.

## Avertissements

En cas de manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire adéquate, des gants jetables et des lunettes de protection.

## Précautions d'emploi

- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu les instructions et la formation adéquates concernant les procédures de PCR en temps réel et de diagnostic in vitro.
- Les échantillons doivent toujours être traités comme infectieux et/ou comme représentant un risque biologique, conformément aux procédures de laboratoire sûres.
- Porter des gants de protection jetables non poudrés, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des échantillons.
- Éviter toute contamination de l'échantillon et des composants du kit par les agents microbiens et les nucléases (DNase/RNase).
- Utiliser systématiquement des cônes de pipettes jetables exempts de DNase/RNase munis de barrières à aérosol.
- Porter systématiquement des gants de protection jetables non poudrés lors de la manipulation des composants du kit.
- Utiliser des zones de travail distinctes et isolées pour les activités de préparation des échantillons, de préparation des tubes réactionnels et d'amplification/de détection. Au laboratoire, le flux de travaux doit progresser dans une seule direction. Porter systématiquement des gants jetables dans chaque zone et en changer avant d'entrer dans une autre zone.
- Dédier des consommables et un équipement aux différentes zones de travail et ne pas les déplacer d'une zone à une autre.
- Conserver les matières positives et/ou susceptibles de l'être séparées de tous les autres composants du kit.
- Ne pas ouvrir les tubes réactionnels/plaques après l'amplification afin d'éviter toute contamination par les produits d'amplification.
- Des contrôles supplémentaires peuvent être testés en fonction des directives ou exigences de réglementations locales, étatiques et/ou fédérales ou d'organisations d'accréditation.
- Ne pas utiliser les composants du kit ayant dépassé la date d'expiration.
- Mettre au rebut les déchets d'échantillons et de dosages conformément aux règles de sécurité locales.

# Stockage et manipulation des réactifs

## Composants du kit

Le kit *artus* HAdV RG PCR est expédié sur carboglace. Les composants du kit doivent être congelés à réception. Si un ou plusieurs composants ne sont pas congelés à réception ou si des tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter les services techniques de QIAGEN pour obtenir une assistance. Dès réception, conserver tous les composants du kit à une température comprise entre -30 °C et -15 °C.

Éviter de décongeler puis de recongeler les réactifs Masters (plus de deux fois), car cela peut nuire aux performances du dosage. Congeler les réactifs par aliquotes s'ils doivent être utilisés de manière intermittente. Ne pas conserver les réactifs à une température de 4 °C pendant plus de 2 heures. Conserver le master HAdV RG Master A et le master HAdV RG Master B à l'abri de la lumière.

Le kit *artus* HAdV RG PCR comprend :

- Deux Masters (HAdV RG Master A et HAdV RG Master B)
- Un contrôle interne (HAdV RG IC)
- Quatre étalons de quantification (HAdV RG QS1–4)
- De l'eau de qualité PCR (H<sub>2</sub>O)

Les Masters HAdV RG Master A et HAdV RG Master B regroupent tous les composants (tampon, enzymes, amorces et sondes) nécessaires à l'amplification et à la détection de l'ADN spécifique de l'HAdV ainsi que le contrôle interne, en une seule réaction.

Les étalons de quantification contiennent des concentrations normalisées d'ADN de l'HAdV. Ils peuvent être utilisés séparément en tant que contrôles positifs ou

ensemble afin de générer une courbe d'étalonnage, qui peut servir à déterminer la concentration en ADN spécifique de l'HAdV dans l'échantillon. La concentration des différents étalons de quantification est présentée dans le tableau 1.

**Tableau 1. Concentration des étalons de quantification**

Étalon de quantification	Concentration (copies/ $\mu$ l)
QS1	10 000
QS2	1 000
QS3	100
QS4	10

## Procédure

### Extraction de l'ADN

Les séquences cibles spécifiques de l'HAdV sont amplifiées à partir de l'ADN. Les performances du dosage étant tributaires de la qualité de l'ADN matriciel, veiller à utiliser un kit de préparation d'échantillons qui fournit de l'ADN adapté à la PCR en aval.

Le minikit QIAamp DNA (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN, référence 51304 ou 51306) est recommandé pour la purification de l'ADN en vue d'une utilisation avec le kit *artus* HAdV RG PCR. Effectuer la purification de l'ADN selon les instructions figurant dans le manuel du minikit QIAamp DNA (*QIAamp DNA Mini Handbook*).

Les tampons de lavage du minikit QIAamp DNA contiennent de l'éthanol. Effectuer une étape supplémentaire de centrifugation avant de procéder à l'élution. Placer la

---

colonne QIAamp Mini Spin dans un nouveau tube de prélèvement de 2 ml et mettre au rebut l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Centrifuger pendant 10 minutes à une vitesse d'environ 17 000 x g (ou 13 000 tr/min) avec une centrifugeuse de paillasse.

**Important :** L'emploi d'un ARN vecteur (CARRIER) est d'une importance cruciale pour l'efficacité de l'extraction et la stabilité des acides nucléiques extraits.

**Important :** L'éthanol est un fort inhibiteur de la PCR en temps réel. Si le kit de préparation des échantillons utilise des tampons de lavage à base d'éthanol, veiller à éliminer toute trace d'éthanol avant l'élution des acides nucléiques.

### Contrôle interne

Le kit *artus* HAdV RG PCR contient un contrôle interne hétérologue qui peut être utilisé soit en tant que contrôle d'inhibition de la PCR, soit en tant que contrôle de la procédure de préparation des échantillons (extraction des acides nucléiques) et contrôle d'inhibition de la PCR.

Si le contrôle interne est utilisé en tant que contrôle d'inhibition de la PCR, mais pas en tant que contrôle de la procédure de préparation des échantillons, ajouter le contrôle interne directement dans le mélange d'HAdV RG Master A et d'HAdV RG Master B, comme le décrit l'étape 2b du protocole (page 15).

Quels que soient la méthode ou le système utilisés pour extraire les acides nucléiques, le contrôle interne ne doit pas être ajouté directement à l'échantillon. Le contrôle interne doit toujours être ajouté au mélange échantillon/tampon de lyse. Le volume de contrôle interne à ajouter au mélange échantillon/tampon de lyse dépend uniquement du volume d'élution et représente 10 % de celui-ci. Par exemple, avec le minikit QIAamp DNA, l'ADN est élué dans 60 µl de tampon AE.

---

Par conséquent, ajouter 6 µl de contrôle interne au mélange échantillon/tampon de lyse pour chaque échantillon.

**Important :** Ne pas ajouter le contrôle interne et l'ARN vecteur (CARRIER) directement à l'échantillon.

## Protocole : détection de l'ADN spécifique de l'HAdV

### Remarques importantes avant de commencer

- Avant de commencer la procédure, lire « Précautions d'emploi », page 9.
- Prendre le temps de se familiariser avec l'appareil Rotor-Gene Q avant de démarrer le protocole. Consulter le manuel d'utilisation de l'appareil.
- S'assurer que chaque cycle de PCR intègre au moins un contrôle positif et un contrôle négatif (eau de qualité PCR).

### Étapes préliminaires

- S'assurer que le bloc réfrigérant (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) a été préalablement refroidi à 2–8 °C.
- Avant chaque utilisation, décongeler complètement tous les réactifs, les mélanger (aspirer et rejeter plusieurs fois à l'aide de la pipette ou agiter brièvement à l'aide d'un vortex) et les centrifuger brièvement.

### Procédure

1. Placer le nombre souhaité de tubes réactionnels pour PCR dans les adaptateurs du bloc réfrigérant.
2. Si le contrôle interne est utilisé pour surveiller la procédure d'isolement de l'ADN et une éventuelle inhibition de la PCR, suivre l'étape 2a. Si le contrôle interne est utilisé exclusivement pour mettre en évidence une inhibition de la PCR, suivre l'étape 2b.

Utiliser le contrôle interne comme décrit à l'étape 2b pour tous les échantillons, les contrôles et les étalons de quantification à analyser.

- 2a. Le contrôle interne a déjà été ajouté au milieu d'isolement (voir « Contrôle interne », page 12). Dans ce cas, préparer un Mastermix, tel que décrit dans le tableau 2.

Le mélange réactionnel contient typiquement tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon.

**Tableau 2. Préparation du Mastermix (contrôle interne utilisé pour surveiller l'isolement de l'ADN et déceler une inhibition de la PCR)**

Composant	1 réaction	12 réactions
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
<b>Volume total</b>	20 µl	240 µl

2b. Le contrôle interne doit être ajouté directement au mélange d'HAdV RG Master A et d'HAdV RG Master B. Dans ce cas, préparer un Mastermix conformément au tableau 3.

Le mélange réactionnel contient tous les composants nécessaires à la PCR, à l'exception de l'échantillon.

**Tableau 3. Préparation du Mastermix (contrôle interne utilisé exclusivement pour surveiller une inhibition de la PCR)**

Composant	1 réaction	12 réactions
HAdV RG Master A	5 µl	60 µl
HAdV RG Master B	15 µl	180 µl
Contrôle interne HAdV RG IC	1 µl	12 µl
<b>Volume total</b>	21 µl	252 µl

\* L'augmentation de volume due à l'addition du contrôle interne est négligeable lors de la préparation du dosage par PCR. La sensibilité du système de détection n'est pas altérée.

3. Distribuer 20 µl de Mastermix dans chaque tube de PCR. Ajouter ensuite 10 µl d'ADN de l'échantillon élué et bien mélanger en aspirant et rejetant le mélange plusieurs fois. De la même manière, ajouter 10 µl d'un contrôle positif ou d'un étalon de quantification ou 10 µl d'eau (de qualité PCR) en tant que contrôle négatif.

S'assurer que chaque cycle intègre au moins un contrôle positif et un contrôle négatif. Utiliser les 4 étalons de quantification (QS1–QS4) pour la quantification.

4. Fermer les tubes de PCR. S'assurer que l'anneau de blocage (accessoire de l'appareil Rotor-Gene Q) est placé en haut du rotor.
5. Pour détecter l'ADN spécifique de l'HAdV, créer un profil de températures en suivant les étapes ci-après.

<b>Définition des paramètres généraux de dosage</b>	<b>Figures 1, 2, 3, 4</b>
<b>Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud</b>	<b>Figure 5</b>
<b>Amplification de l'ADN</b>	<b>Figure 6</b>
<b>Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence</b>	<b>Figure 7</b>
<b>Démarrage du cycle</b>	<b>Figure 8</b>

Toutes les spécifications font référence au logiciel Rotor-Gene Q version 2.3.1 et ultérieure. Le manuel d'utilisation fournit de plus amples informations sur la programmation des appareils Rotor-Gene Q. Dans les images suivantes, ces réglages sont encadrés en noir et en gras.

6. Commencer par ouvrir la boîte de dialogue **New Run Wizard** (Assistant Nouveau cycle) version **Advanced** (Avancé) et sélectionner **Two Step** (Deux étapes) (figure 1). Cliquer sur **Next** (Suivant) pour continuer.

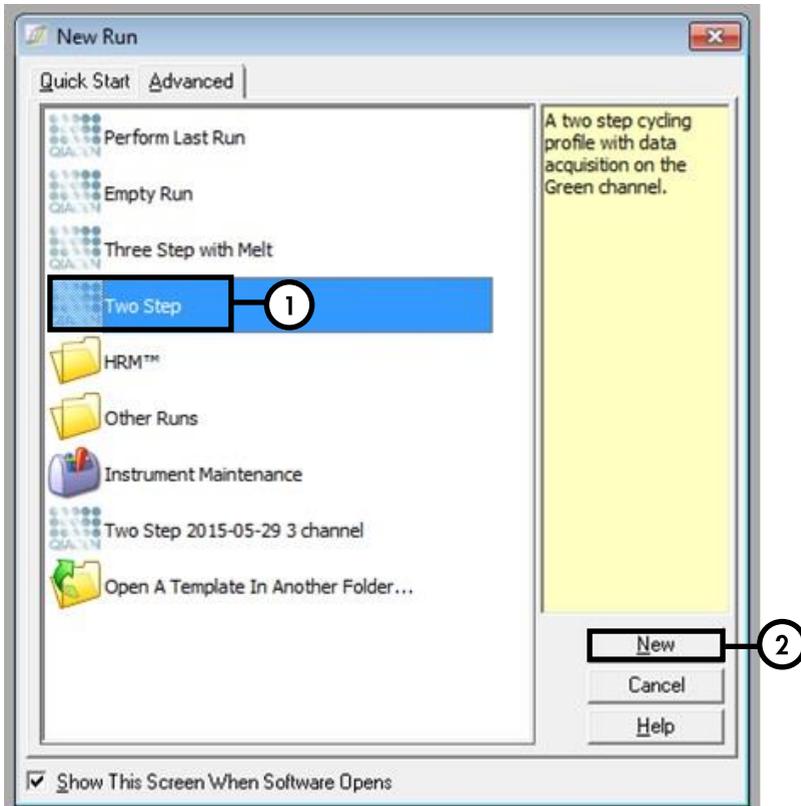


Figure 1. Boîte de dialogue New Run (Nouveau cycle).

7. Dans la boîte de dialogue **New Run Wizard** suivante (figure 2), cochez la case **Locking Ring Attached** (Anneau de blocage fixé) et cliquez sur **Next**.

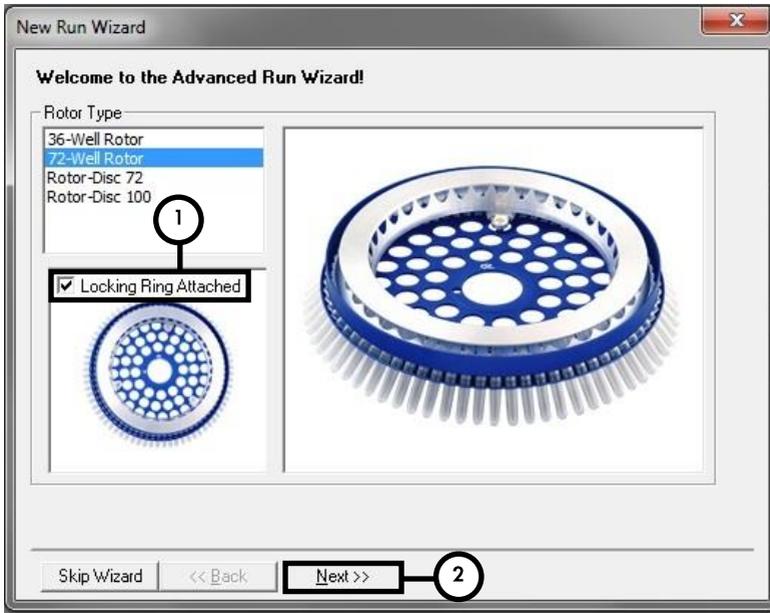


Figure 2. Boîte de dialogue New Run Wizard.

8. Sélectionner **30** comme volume de réaction de la PCR et cliquer sur **Next** (figure 3).

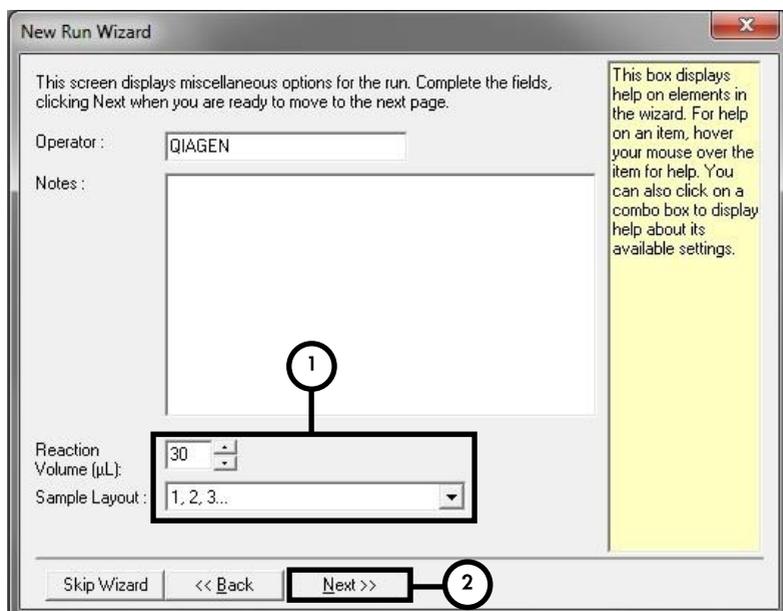


Figure 3. Définition des paramètres généraux de dosage.

9. Dans la boîte de dialogue **New Run Wizard**, cliquer sur le bouton **Edit Profile** (Modifier profil) (figure 4) et programmer le profil de températures comme indiqué sur les figures 5-6.

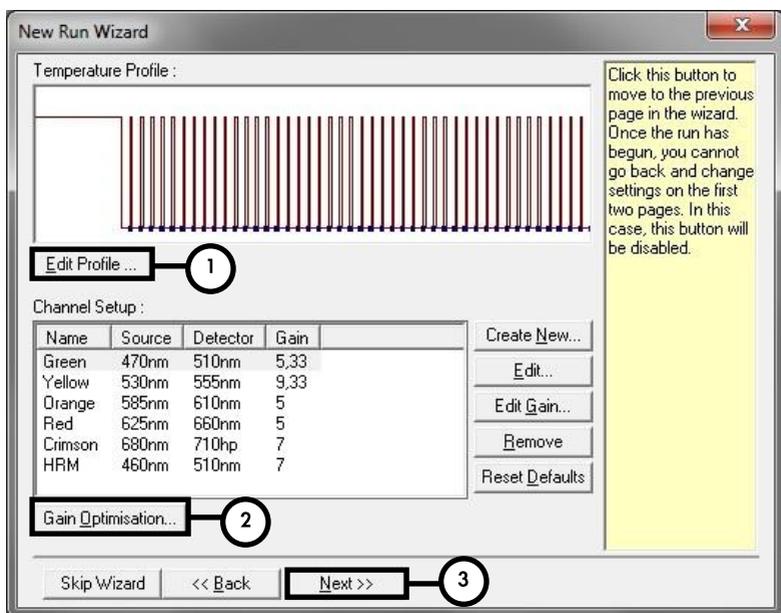


Figure 4. Modification du profil.

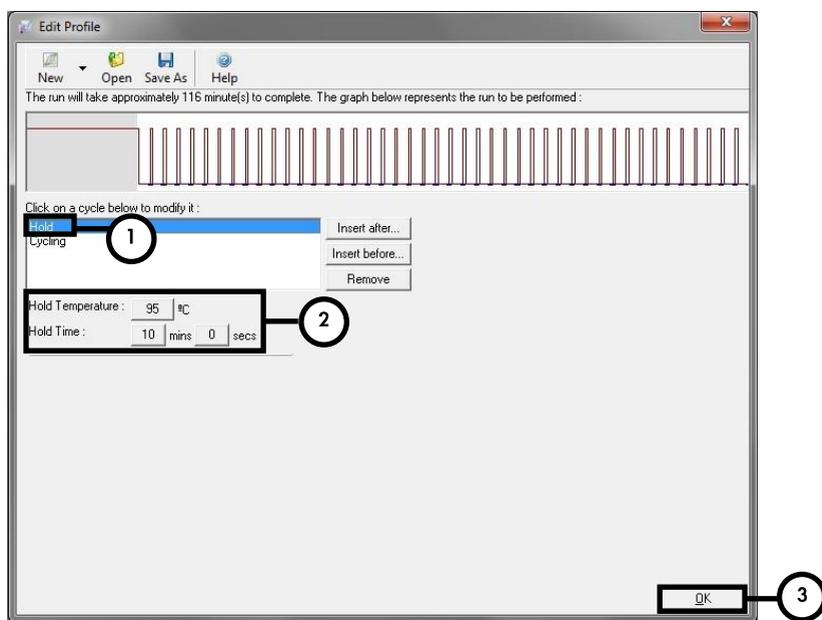


Figure 5. Activation initiale de l'enzyme à démarrage à chaud.

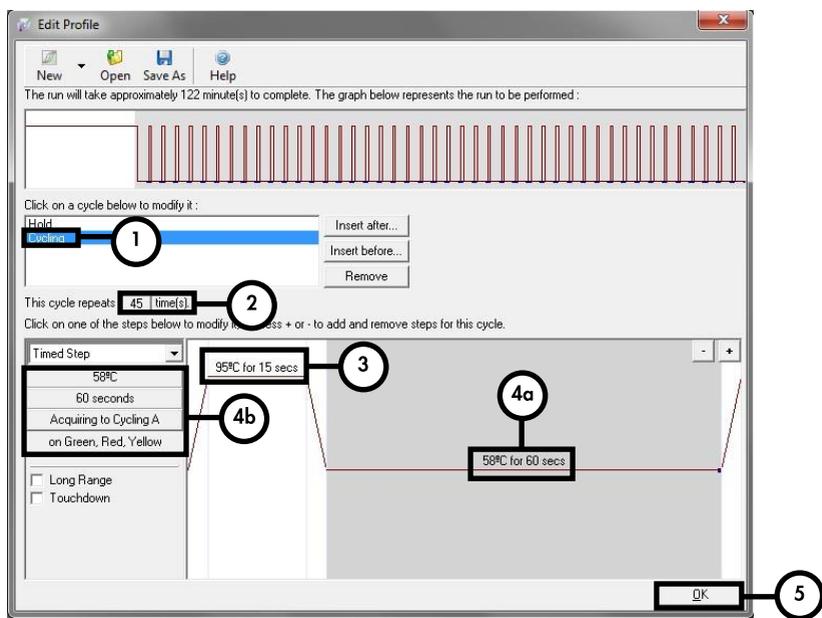


Figure 6. Amplification de l'ADN.

10. La plage de détection des canaux de fluorescence doit être déterminée selon les intensités de fluorescence des tubes de PCR. Dans la boîte de dialogue **New Run Wizard**, cliquer sur **Gain Optimisation** (Optimisation du gain) (voir figure 4, étape 2) pour ouvrir la boîte de dialogue **Auto-Gain Optimisation Setup** (Configuration de l'optimisation du gain automatique) (figure 7). Cocher la case **Perform Optimisation Before 1st Acquisition** (Réaliser l'optimisation avant la 1<sup>re</sup> acquisition) (figure 7). S'assurer que les deux canaux (Green et Yellow) sont sélectionnés pour **Auto-Gain Optimisation** (Optimisation du gain automatique) (figure 7). (Trouver les canaux dans le menu déroulant sous **Channel Settings** [Paramètres de canal] et cliquer sur **Add** [Ajouter].) Dans la boîte de dialogue **Auto-Gain Optimisation Setup**, cliquer sur **Close** (Fermer) à la fin de l'étalonnage du gain.

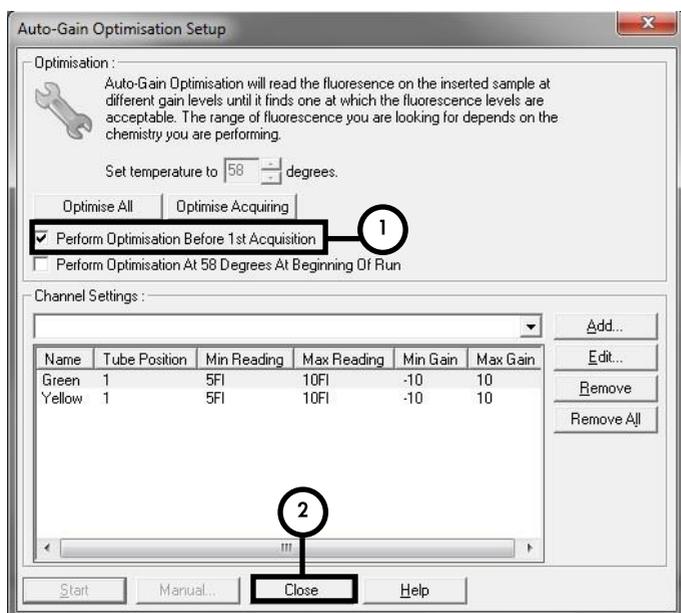
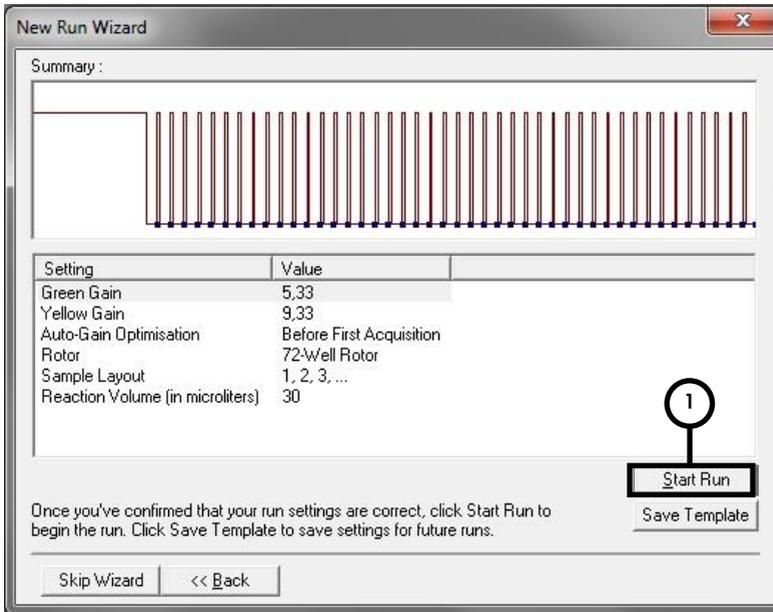


Figure 7. Ajustement de la sensibilité des canaux de fluorescence.

11. Les valeurs de gain déterminées par l'étalonnage des canaux sont automatiquement enregistrées et répertoriées dans la dernière fenêtre de menu de la procédure de programmation (figure 8). Cliquer sur **Start Run** (Démarrer le cycle).



**Figure 8. Démarrage du cycle.**

12. Une fois le cycle achevé, analyser les données (voir « Interprétation des résultats », page 25).

# Interprétation des résultats

## Validité du cycle

### Cycle qualitatif valide

Les conditions de contrôle suivantes doivent être remplies pour qu'un cycle qualitatif soit valide (tableau 4).

**Tableau 4. Conditions de contrôle pour un cycle qualitatif valide**

Contrôle	Canal de détection	
	Cycling Green	Cycling Yellow
Contrôle positif (QS)	POSITIF	POSITIF
Contrôle négatif	NÉGATIF	POSITIF

### Cycle qualitatif non valide

Un cycle qualitatif est non valide s'il n'a pas été terminé ou si l'une quelconque des conditions de contrôle d'un cycle qualitatif valide n'a pas été remplie.

Si un cycle qualitatif est non valide, répéter la PCR ou extraire à nouveau l'ADN des échantillons d'origine s'il ne reste plus d'ADN.

### Cycle quantitatif valide

Un cycle quantitatif est valide si toutes les conditions de contrôle d'un cycle qualitatif valide sont remplies (voir tableau 4 ci-dessus). Par ailleurs, pour obtenir des résultats de quantification précis, une courbe d'étalonnage valide doit être générée. Pour un cycle quantitatif valide, la courbe d'étalonnage doit comporter les valeurs de contrôle suivantes (tableau 5).

**Tableau 5. Paramètres de contrôle d'une courbe d'étalonnage valide**

<b>Paramètre de contrôle</b>	<b>Valeur valide</b>
Pente	-3,743/-2,765
Efficacité de la PCR	85 %/130 %
R au carré (R <sup>2</sup> )	> 0,98

### Cycle quantitatif non valide

Un cycle quantitatif est non valide s'il n'a pas été terminé ou si l'une quelconque des conditions de contrôle d'un cycle quantitatif valide n'a pas été remplie.

Si un cycle quantitatif est non valide, répéter la PCR ou extraire à nouveau l'ADN des échantillons d'origine s'il ne reste plus d'ADN.

### Analyse qualitative

Le tableau 6 fournit une synthèse de l'interprétation des résultats.

**Tableau 6. Résumé de l'interprétation des résultats**

Échantillon	Canal de détection		Interprétation des résultats
	Cycling Green	Cycling Yellow	
A	POSITIF	POSITIF*	ADN spécifique de l'HAdV détecté.
B	NÉGATIF	POSITIF	ADN spécifique de l'HAdV non détecté. L'échantillon ne contient pas d'ADN de l'HAdV en quantité détectable.
C	NÉGATIF	NÉGATIF	Inhibition de la PCR ou dysfonctionnement du réactif. Répéter la procédure en utilisant l'échantillon d'origine ou prélever et tester un nouvel échantillon.

\* La détection du contrôle interne dans le canal de détection Cycling Yellow n'est pas obligatoire si des résultats positifs ont été obtenus dans le canal de détection Cycling Green. Une forte charge virale d'HAdV dans l'échantillon peut entraîner une réduction ou une absence des signaux du contrôle interne.

## Analyse quantitative

Le kit *artus* HAdV RG PCR contient quatre étalons de quantification (QS). Pour générer une courbe d'étalonnage en vue de l'analyse quantitative, ces étalons doivent être définis comme tels avec les concentrations adéquates (voir tableau 1, page 11). Une courbe d'étalonnage peut être générée en vue de l'analyse quantitative en utilisant des étalons de concentrations connues.

$$C_T = m \log(N_0) + b$$

- $C_T$  = cycle seuil
- $m$  = pente
- $N_0$  = concentration initiale
- $b$  = ordonnée à l'origine

Les concentrations des échantillons positifs de concentration inconnue peuvent être obtenues à partir de la courbe d'étalonnage (figure 9).

$$N_0 = 10^{(C_T - b)/m}$$

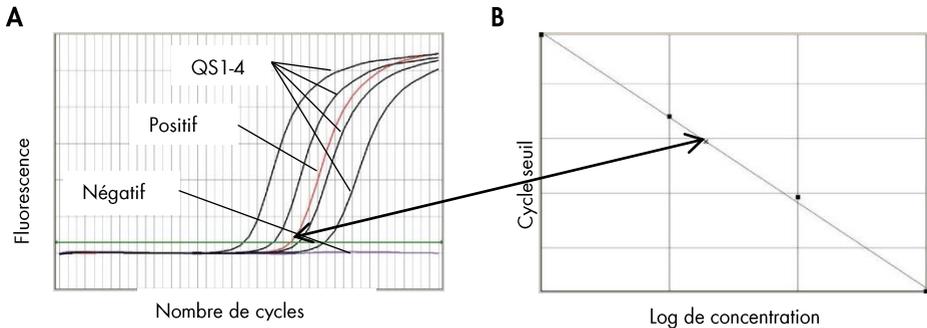


Figure 9. Étalon de quantification, un échantillon positif et un échantillon négatif affichés sur (A) un tracé d'amplification et (B) l'analyse de la courbe d'étalonnage.

**Remarque :** La concentration de l'échantillon est affichée en nombre de copies/ $\mu$ l et fait référence à la concentration en ADN viral dans l'éluat.

Utiliser la formule suivante pour déterminer la charge virale de l'échantillon d'origine.

$$\text{Charge virale (échantillon)} \left[ \frac{\text{copies}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Volume (éluat)} \left[ \mu\text{l} \right] \times \text{charge virale (éluat)} \left[ \frac{\text{copies}}{\mu\text{l}} \right]}{\text{Volume d'échantillon} \left[ \text{ml} \right]}$$

---

## Limites

- L'utilisation de ce produit est réservée au personnel ayant reçu les instructions et la formation adéquates concernant les procédures de PCR en temps réel et de diagnostic in vitro.
- Le respect des bonnes pratiques de laboratoire est essentiel pour que ce dosage fonctionne correctement.
- Il est impératif de maintenir la pureté des composants du kit et des préparations de tubes réactionnels. Surveiller étroitement tous les réactifs pour détecter des impuretés et une contamination. Mettre au rebut tout réactif dans lequel une contamination est soupçonnée.
- Des procédures appropriées de prélèvement, transport, conservation et traitement des échantillons sont essentielles pour que ce dosage fonctionne de manière optimale.
- Ne pas utiliser ce dosage directement sur l'échantillon. Réaliser les procédures pertinentes d'extraction des acides nucléiques avant d'utiliser ce dosage.
- La présence d'inhibiteurs de PCR peut entraîner des résultats faux négatifs ou non valides.
- Des mutations potentielles dans les régions cibles du génome de l'HAAdV couvertes par les amorces et/ou les sondes utilisées dans le kit peuvent empêcher de détecter la présence des agents pathogènes.
- Comme pour tout test de diagnostic, interpréter les résultats obtenus avec le kit *artus* HAAdV RG PCR en tenant compte de toutes les données cliniques et biologiques.

## Contrôle de la qualité

Chaque lot du kit *artus* HAAdV RG PCR est testé sur la base de spécifications prédéterminées pour garantir une qualité homogène du produit.

---

## Caractéristiques de performance

Étant donné qu'il n'existe aucun étalon international pour l'adénovirus, l'évaluation des performances quantitatives du kit *artus* HAdV RG PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique issu d'un isolat d'HAdV3 caractérisé (espèce B).

De l'ADN génomique des espèces d'adénovirus A–F a été analysé avec le kit *artus* HAdV RG PCR pour évaluer les performances qualitatives. L'ADN génomique était issu de l'ATCC® (American Type Culture Collection) et d'isolats de cultures cellulaires caractérisés. Un plasmide contenant la séquence cible pertinente a été utilisé pour l'analyse de l'espèce G (sérotypage HAdV-52) (tableau 7).

**Tableau 7. Espèces et sérotypes d'adénovirus analysés avec le kit *artus* HAdV RG PCR**

<b>Espèce d'HAdV</b>	<b>Sérotipe d'HAdV</b>	<b>Source</b>	<b>Résultats obtenus avec le kit <i>artus</i> HAdV RG PCR</b>
Espèce A	HAdV-12	ATCC-VR-863D	Positif
	HAdV-31	Isolat caractérisé issu d'une culture cellulaire	Positif
	HAdV-18	Plasmide	Positif
Espèce B1	HAdV-3	ATCC-VR-3, ATCC-VR-857D	Positif
	HAdV-7	Plasmide	Positif
Espèce B2	HAdV-35	ATCC-VR-718D	Positif
	HAdV-11	Isolat caractérisé issu d'une culture cellulaire	Positif
	HAdV-55	Plasmide	Positif
Espèce C	HAdV-1	ATCC-VR-1	Positif
	HAdV-2	Plasmide	Positif
	HAdV-5	ATCC-VR-5D	Positif
	HAdV-6	Isolat caractérisé issu d'une culture cellulaire	Positif
Espèce D	HAdV-37	ATCC-VR-929D	Positif
	HAdV-19	Plasmide	Positif
Espèce E	HAdV-4	ATCC-VR-1572D	Positif
Espèce F	HAdV-41	ATCC-VR-930D	Positif
Espèce G	HAdV-52	Plasmide	Positif

## Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du kit *artus* HAdV RG PCR est définie comme la concentration (copies par  $\mu\text{l}$  d'éluat) de l'ADN spécifique de l'HAdV pouvant être détectée avec un taux de positivité  $\geq 95\%$ . La sensibilité analytique a été déterminée par l'analyse d'une série de dilutions d'ADN génomique quantifié d'adénovirus (groupe B, sous-type 3) (tableau 8).

**Tableau 8. Résultats de PCR utilisés pour calculer la sensibilité analytique du kit *artus* HAdV RG PCR**

Concentration d'entrée (copies/ $\mu\text{l}$ )	Nombre de réplicats	Nombre de positifs	Pourcentage de détection (%)	Contrôle interne
31,6	18	18	100	Valide
10,0	18	18	100	Valide
3,2	18	18	100	Valide
1,0	18	18	100	Valide
0,3	18	12	67	Valide
0,1	18	7	39	Valide
0,03	18	3	17	Valide
0,01	18	1	6	Valide
0,003	18	0	0	Valide

La sensibilité analytique du kit *artus* HAdV RG PCR, déterminée par analyse de probit, pour la détection de l'ADN spécifique de l'HAdV est de 1,07 copie/ $\mu\text{l}$  (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 0,58-2,99 copies/ $\mu\text{l}$ ).

## Spécificité analytique

La spécificité analytique du kit *artus* HAdV RG PCR est garantie par la sélection rigoureuse des oligonucléotides (amorces et sondes). Les oligonucléotides sont vérifiés au moyen d'une analyse par comparaison de séquences avec les séquences disponibles dans le domaine public afin de s'assurer que tous les génotypes d'adénovirus pertinents sont détectés.

La spécificité analytique du kit *artus* HAdV RG PCR a été évaluée en testant un panel d'ADN/ARN génomique extrait d'autres agents pathogènes provoquant des symptômes similaires à ceux des infections à adénovirus et en testant de l'ADN génomique humain (tableau 9).

**Tableau 9. Organismes testés pour démontrer la spécificité analytique du kit *artus* HAdV RG PCR**

Organisme	Canal de détection	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
ADN génomique humain	Négatif	Valide
Virus varicella-zoster	Négatif	Valide
Virus herpes simplex 1	Négatif	Valide
Virus herpes simplex 2	Négatif	Valide
Virus d'Epstein-Barr	Négatif	Valide
Herpèsvirus humain 6 (A, B)	Négatif	Valide
Herpèsvirus humain 7	Négatif	Valide
Cytomégalovirus	Négatif	Valide
Virus BK	Négatif	Valide
Virus JC	Négatif	Valide
Virus vacuolant (SV40)	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite A	Négatif	Valide

Organisme	Canal de détection	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
Virus de l'hépatite B	Négatif	Valide
Virus de l'hépatite C	Négatif	Valide
Virus de l'immunodéficience humaine 1	Négatif	Valide
Parvovirus B19	Négatif	Valide
<i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Négatif	Valide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	Valide
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Négatif	Valide
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Négatif	Valide

Organisme	Canal de détection	
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
<i>Neisseria meningitidis</i>	Négatif	Valide
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Négatif	Valide
	Cycling Green (HAdV)	Cycling Yellow (IC)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Négatif	Valide
Coronavirus	Négatif	Valide
Virus grippal A (incl. H1N1-2009), B	Négatif	Valide
Virus respiratoire syncytial A, B	Négatif	Valide
Para-influenza 1–4	Négatif	Valide
Métapneumovirus humain	Négatif	Valide
Rhinovirus	Négatif	Valide

Le kit *artus* HAdV RG PCR n'a réagi avec aucun des organismes spécifiés.

---

## Plage linéaire

La plage linéaire du kit *artus* HAdV RG PCR a été évaluée par analyse d'une série de dilutions logarithmique de l'ADN génomique quantifié de l'HAdV-2 (espèce C) en utilisant des concentrations comprises entre  $1 \times 10^9$  copies/ $\mu$ l et 0,1 copie/ $\mu$ l. Six réplicats ont été analysés par dilution.

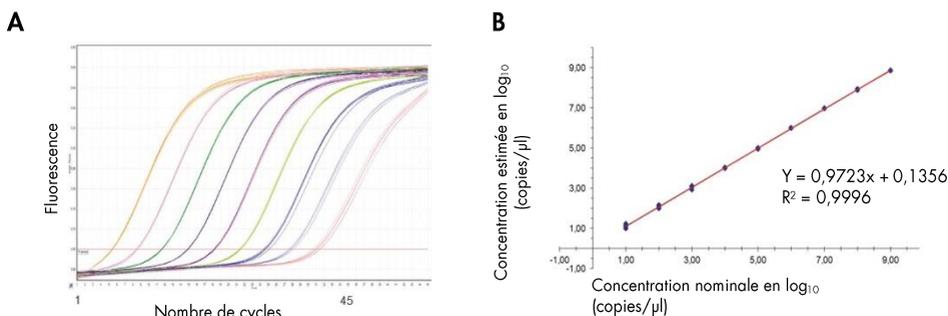


Figure 10. Courbe d'amplification (A) et analyse de régression linéaire (B) d'une série de dilutions de l'ADN génomique de l'HAdV-2 (espèce C).

La plage linéaire du kit *artus* HAdV RG PCR s'étend sur au moins 8 ordres de grandeur pour l'ADN spécifique de l'HAdV.

## Précision

La précision du kit *artus* HAdV RG PCR a été déterminée par la variabilité intradosage (variabilité au sein d'un même essai), la variabilité interdosage (variabilité entre différents essais) et la variabilité interlot (variabilité entre différents lots de production).

Les données de variabilité sont exprimées en écart-type et coefficient de variation. Les données sont basées sur l'analyse de quantification de concentrations définies de l'ADN génomique de l'HAdV et les valeurs du cycle seuil ( $C_T$ ), sur le contrôle interne (tableaux 10 et 11, respectivement). Au moins 6 répliquats par échantillon ont été analysés pour la variabilité intradosage, interdosage et interlot. La variance totale a été calculée en combinant les trois analyses.

**Tableau 10. Données de précision du système de détection spécifique de l'ADN de l'HAdV du kit *artus* HAdV RG PCR**

Système spécifique de l'HAdV	Conc. moyenne (copies/ $\mu$ l)	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	26,88	4,87	18,13
Variabilité interdosage	35,11	8,65	24,63
Variabilité interlot	27,39	4,65	16,97
Variance totale	32,37	8,44	26,09

**Tableau 11. Données de précision pour le contrôle interne du kit *artus* HAdV RG PCR**

Contrôle interne	Cycle seuil moyen (C <sub>t</sub> )	Écart-type	Coefficient de variation (%)
Variabilité intradosage	21,97	0,15	0,67
Variabilité interdosage	22,12	0,19	0,87
Variabilité interlot	22,05	0,25	1,12
Variance totale	22,02	0,22	0,99

## Évaluation en diagnostic

La sensibilité et la spécificité en diagnostic du kit *artus* HAdV RG PCR sont régulièrement évaluées par l'analyse d'échantillons de référence et de diagnostic précédemment analysés par des méthodes de référence (à savoir, PCR maison, immunofluorescence directe [IFD], culture sur lamelle en flacon, microscopie électronique, technologie Luminex®). À ce jour, 223 échantillons issus de frottis, de prélèvements rhinopharyngés, de sécrétions bronchiques, d'échantillons de selles, d'échantillons urinaires, d'étalements sur lame de plasma ou de prélèvements oculaires recueillis dans différents laboratoires ont été testés pour déterminer la sensibilité et la spécificité en diagnostic du kit *artus* HAdV RG PCR. Sur ces

223 échantillons, 50 ont été déclarés positifs pour l'HAAdV et 173, négatifs pour l'HAAdV selon des méthodes de référence (tableau 12). Quatre échantillons qui avaient donné des résultats négatifs avec un test de PCR maison ont obtenu des résultats positifs pour l'HAAdV (valeurs de  $C_T$  : 35,2, 36,8, 40,0 et 37,9) avec le kit *artus* HAAdV RG PCR. La positivité a été confirmée par analyse avec le kit *artus* HAAdV RG PCR pour l'ensemble des 50 échantillons déclarés contenir de l'ADN de l'HAAdV.

**Tableau 12. Évaluation en diagnostic du kit *artus* HAAdV RG PCR**

		Kit <i>artus</i> HAAdV RG PCR	
		NÉGATIF	POSITIF
Méthode de référence	NÉGATIF	169	4*
	POSITIF	0	50

\* Valeurs de  $C_T$  : 35,2, 36,8, 40,0 et 37,9.

## Répétabilité

La spécificité, la sensibilité et la précision de quantification du kit *artus* HAAdV RG PCR ont été évaluées par l'analyse de panels de compétence établis pour l'adénovirus. Pour garantir la répétabilité du kit *artus* HAAdV RG PCR, la spécificité et la sensibilité sont évaluées par l'analyse régulière de panels de compétence établis pour l'adénovirus ainsi que d'échantillons diagnostiques caractérisés.

**Tableau 13. Résultats de l'analyse d'un panel de compétence pour l'HAdV (QCMD) avec le kit *artus* HAdV RG PCR**

Échantillon	Panel de compétence		Kit <i>artus</i> HAdV RG PCR	
	Contenu de l'échantillon	Conc. attendue (copies/ml)	Résultat	Contrôle interne
14-01	HAdV-1	2 793	Positif	Valide
14-02	HAdV-1	13 213	Positif	Valide
14-03	HAdV-1	2 793	Positif	Valide
14-04	HAdV-1	4 093	Positif	Valide
14-05	HAdV-4	2 032	Positif	Valide
14-06	HAdV-4	21 281	Positif	Valide
14-07	Négatif	0	Négatif	Valide
14-08	HAdV-14	426 580	Positif	Valide
14-09	HAdV-5	241	Positif	Valide
14-10	HAdV-5	1 820	Positif	Valide

# Symboles

Les symboles figurant dans le tableau suivant sont utilisés dans cette notice d'utilisation.

## Symbole

## Définition des symboles

---



96

Contient suffisamment de réactifs pour 96 tests



Dispositif médical de diagnostic in vitro



Référence



Numéro de lot



Limites de température



Fabricant

## Symbole

## Définition des symboles

---



Utiliser jusqu'au



Référence du matériel



Référence marché international



Consulter la notice d'utilisation

## Résolution des principaux problèmes rencontrés

Les scientifiques des services techniques de QIAGEN seront ravis de répondre à toutes les questions sur les informations et protocoles figurant dans ce manuel ou sur les technologies d'échantillons et de dosage (pour les coordonnées, visiter le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Pour commander

Produit	Contenu	Référence
<i>artus</i> HAdV RG PCR Kit (96)	Pour 96 réactions : Master A, Master B, 4 étalons de quantification, contrôle interne, H <sub>2</sub> O (eau de qualité PCR)	4530265
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Pour 50 préparations d'ADN : 50 colonnes QIAamp Mini Spin, protéinase K, réactifs, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	51304
QIAamp DNA Mini Kit (250)	Pour 250 préparations d'ADN : 250 colonnes QIAamp Mini Spin, protéinase K, réactifs, tampons, tubes de prélèvement (2 ml)	51306
<b>Rotor-Gene Q et accessoires</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9002023

---

Rotor-Gene Q MDx 5plex  
Platform

Thermocycleur de PCR en temps réel à  
5 canaux (vert, jaune, orange, rouge,  
pourpre), ordinateur portable, logiciel,  
accessoires, garantie 1 an pièces et  
main d'œuvre, installation et formation  
non comprises

9002022

<b>Produit</b>	<b>Contenu</b>	<b>Référence</b>
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package Plus	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 3 ans pièces et main d'œuvre et 3 visites de maintenance préventive	9001866
Rotor-Gene Q 5plex Priority Package	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 2 ans pièces et main d'œuvre et 2 visites de maintenance préventive	9001865
Rotor-Gene Q 5plex System	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9001640
Rotor-Gene Q 5plex Platform	Thermocycleur de PCR en temps réel à 5 canaux (vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001570

Produit	Contenu	Référence
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package Plus	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 3 ans pièces et main d'œuvre et 3 visites de maintenance préventive	9001870
Rotor-Gene Q 6plex Priority Package	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires : inclut le progiciel prioritaire avec logiciel, installation, formation, garantie 2 ans pièces et main d'œuvre et 2 visites de maintenance préventive	9001869
Rotor-Gene Q 6plex System	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation comprises	9001660
Rotor-Gene Q 6plex Platform	Appareil de PCR en temps réel à 6 canaux (bleu, vert, jaune, orange, rouge, pourpre), ordinateur portable, logiciel, accessoires, garantie 1 an pièces et main d'œuvre, installation et formation non comprises	9001590

Produit	Contenu	Référence
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Bloc en aluminium pour la préparation manuelle des tubes réactionnels à l'aide d'une pipette monocanal dans 72 tubes de 0,1 ml	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 1 000 réactions	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 rangées de 4 tubes et bouchons pour 10 000 réactions	981106

#### Accord de licence limitée pour le kit *artus* HA<sub>d</sub>V RG PCR

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur du produit accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à ce manuel, et avec les composants fournis à l'intérieur du kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, le présent manuel et les autres protocoles disponibles sur le site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par des utilisateurs QIAGEN pour les utilisateurs QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été testés de manière approfondie ni optimisés par QIAGEN. QIAGEN n'offre aucune garantie sur eux ni aucune garantie qu'ils n'enfreignent pas les droits de tiers.
2. Hormis les licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son(ses) utilisation(s) ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toute licence, expresse ou tacite, autre que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits dans les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour accéder aux conditions de licence mises à jour, voir [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

L'achat de ce produit permet à l'acheteur de l'utiliser pour poser des diagnostics humains in vitro. Aucun brevet général ni licence d'aucune sorte autre que ce droit spécifique d'utilisation à l'achat n'est accordé par la présente.

Marques de commerce : QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group) ; ATCC® (American Type Culture Collection Corporation) ; FAM™, JOET™ (Life Technologies Corporation) ; Luminex® (Luminex Corporation).

HB-2010-001

© 2015, Altona Diagnostics GmbH, tous droits réservés.

---

Pour commander [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) | Support technique [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Site Web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

