

## RIDA® GENE Adenovirus

**REF** PG1005



Deutsch .....	3
English.....	23
Español.....	43
Français.....	63
Italiano .....	83

# RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus

**REF** PG1005

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Adenovirus aus humanen Stuhlproben, Rachenspülwasser, Sputum sowie bronchoalveolärer Lavage (BAL).

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch Adenovirus verursachten respiratorischen Infektion unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Adenoviren sind unbehüllte ikosaedrische doppelsträngige DNA (dsDNA) Viren und gehören zur Familie der *Adenoviridae*. Sie wurden aus humanen Rachenmandeln (Adenoiden) isoliert, woher auch ihr Name stammt.<sup>1</sup> Man unterscheidet 56 humanpathogene Adenovirus-Serotypen, die in sieben Gruppen (A - G) unterteilt werden.<sup>4,5</sup> Adenoviren verursachen eine Reihe von sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern, in den meisten Fällen handelt es sich aber neben okularen und gastrointestinalen Infektionen überwiegend um Erkrankungen der Atemwege. Hierbei sind Kinder unter vier Jahren durch das Fehlen eines humoralen Immunsystems häufiger betroffen, jedoch werden 1 – 7 % der respiratorischen Infektionen von Erwachsenen durch Adenoviren verursacht.<sup>1</sup> Die Symptome einer Adenovirus-Infektion reichen von Erkältung, über akute Bronchitis bis hin zu Pneumonien und in immunsupprimierten Patienten kann es auch zum Acute Respiratory Distress-Syndrom (ARDS) kommen. Akute respiratorische Erkrankungen werden hauptsächlich durch die Serotypen 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14 und 21 hervorgerufen, während die Serotypen 1, 2, 3, 4 und 7 die häufigste Ursache von Pneumonien sind. Einige Adenovirus-Serotypen sind endemisch, wobei Adenovirus-Ausbrüche vor allem in militärischen Einrichtungen beschrieben sind.<sup>2</sup> Eine neuere Variante des Serotyps 14 hat 2006/2007 in den USA zu einem Ausbruch einer schweren respiratorischen Erkrankung mit einer Mortalitätsrate von 5 % geführt.<sup>3</sup> Das klinische Spektrum einer Adenovirus-Infektion ist unter anderem auch von seiner Eintrittspforte abhängig. Zum Beispiel führt eine Inhalation von Adenovirus 7 zu einer schweren Erkrankung der unteren Atemwege, während eine orale Aufnahme dieses Serotyps zu keiner oder einer milden Infektion führt. Der RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus Test wurde zur Unterstützung der Diagnose von respiratorischen Infektionen entwickelt, es können

aber auch Adenovirus-Serotypen, welche primär gastrointestinale Infektionen hervorrufen (Serotyp 40 und 41) aus Stuhlproben nachgewiesen werden.

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Adenovirus aus humanen Stuhlproben, Rachenspülwasser, Sputum sowie bronchoalveolarer Lavage (BAL).

Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragemente für Adenovirus (Hexon) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen von Adenovirus werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)**

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

### 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).

- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Adenovirus multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

**Tab.2:** Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Roche	MagNA Pure 96
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.**

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei)

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Die Angaben des Herstellers sind zu beachten. Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser (bzw. bei Verwendung des MagNA Pure 96 mit S.T.A.R. Buffer) zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1.000 x g zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab.4).

Wird die Internal Control DNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control DNA während

der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 8.2 DNA-Präparation aus Rachenspülwasser, Sputum und bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Für die DNA-Präparation aus Rachenspülwasser, Sputum und bronchoalveolärer Lavage (BAL) wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Der RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab.4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.3, Tab.4). Vor der Benutzung den Reaction Mix, die Taq-Polymerase, die Positive Control, die No Template Control und die Internal Control DNA auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<u>Reaction Mix</u>	19,3 µl	212,3 µl
2	<u>Taq-Polymerase</u>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.



**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren

## 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

**Negativkontrolle:** Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

**Proben:** Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 DNA real-time PCR-Profil

**Tab. 5:** DNA real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie und Rotor-Gene Q

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 6:** DNA real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

### 9.3.2 Universal real-time PCR-Profil

**Hinweis: Das Universal real-time PCR-Profil für DNA Tests sollte nur verwendet werden, wenn RIDA® GENE DNA und RIDA® GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.**

**Tab. 7:** Universal real-time PCR-Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.**

**Tab. 8:** Universal real-time PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, CFX96™ und Rotor-Gene Q

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.**

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 9: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Hinweis
Roche LightCycler® 2.0	Adenovirus	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	Adenovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Adenovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
ABI 7500	Adenovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Adenovirus	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Adenovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICD	Yellow	

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 10, Abb. 1).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/  $\mu\text{l}$  vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 10:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * <sup>1</sup>	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

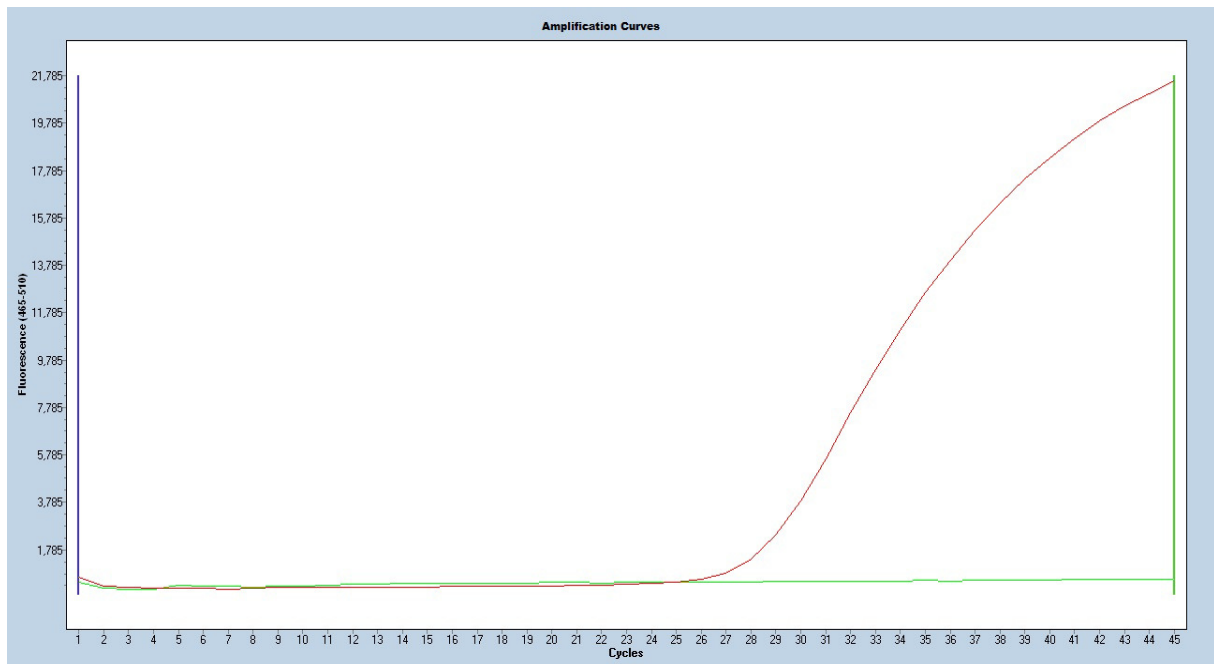
\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Adenovirus) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Interpretation der Ergebnisse

Zielgene		
Adenovirus	ICD	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	Adenovirus nachweisbar
negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Adenovirus ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Adenovirus ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control DNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control DNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control DNA führen können.

Adenovirus ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control DNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für humane Stuhlproben, Rachenspülwasser, Sputum und bronchoalveoläre Lavage (BAL) geeignet.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zielgen (Hexon) vorhanden ist.

## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 118 extrahierte respiratorische Proben mit dem RIDA®GENE Adenovirus Test und einer in-house real-time PCR in einem Institut in Deutschland untersucht.

**Tab. 12:** Korrelation der Adenovirus-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Adenovirus real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

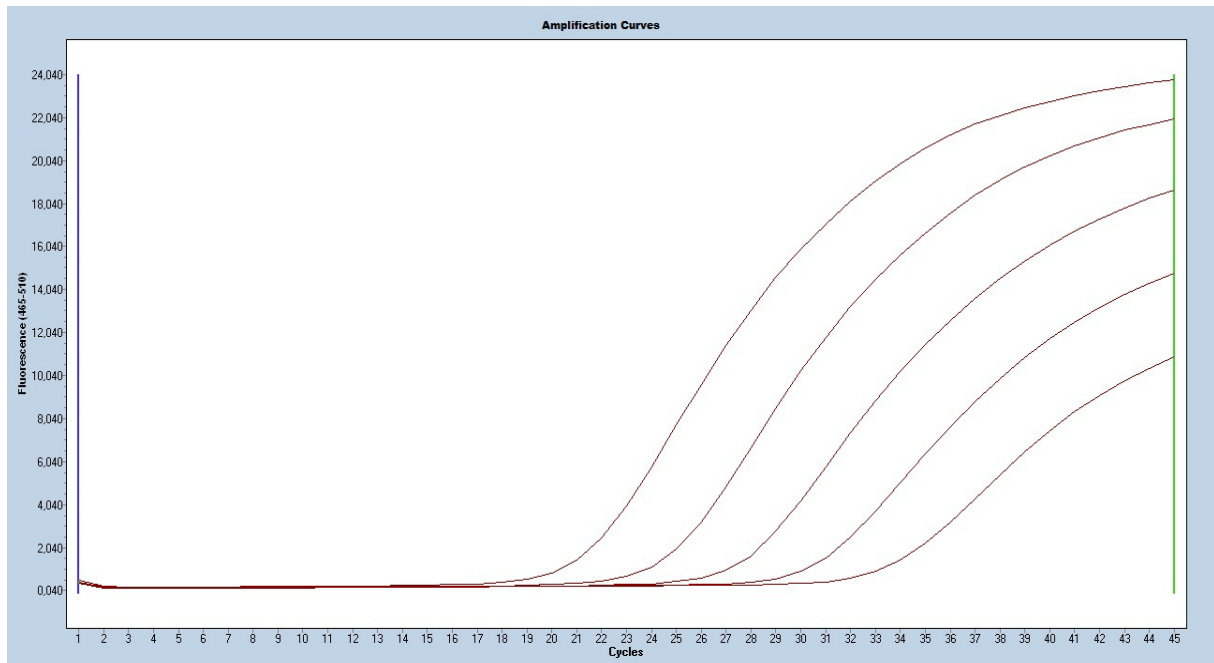
		In-house real-time PCR			
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Adenovirus	Positiv	16	0	16	PPV: 100 %
	Negativ	0	102	102	NPV: 100%
	Insgesamt	16	102	118	



## 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien/Reaktion für Adenovirus.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von Adenovirus ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/  $\mu\text{l}$ ) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Abb. 2:** Verdünnungsreihe Adenovirus ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/  $\mu\text{l}$ ) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Adenovirus multiplex real-time PCR ist spezifisch für Adenovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 13):

**Tab. 13:** Kreuzreaktivitätstestung

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Coronavirus 229E, human	-	Norovirus GGII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Coxsackie virus B4, human	-	Parainfluenza virus 1 strain C35, human	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Cytomegalovirus, human	-	Parainfluenza virus 2 strain Greer, human	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Parainfluenza virus 4b strain CH19503, human	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>Lari</i>	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Rhinovirus, human, Genogruppe A	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Clostridium bifermentas</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Influenza virus A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Metapneumovirus, human	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR wurde mit jeweils einem Serotyp exemplarisch für jede Serogruppe der Adenoviren untersucht (s. Tab. 14). Alle Adenoviren des Probenpanels wurden mit der RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR nachgewiesen.

**Tab. 14:** Analytische Reaktivitätstestung










Adenovirus					
<b>Serogruppe A</b>					
Serotyp 31	+				
<b>Serogruppe B</b>					
Serotyp 7A	+	Serotyp 11	+		
<b>Serogruppe C</b>					
Serotyp 1	+	Serotyp 5	+		
<b>Serogruppe D</b>					
Serotyp 37	+				
<b>Serogruppe E</b>					
Serotyp 4	+				
<b>Serogruppe F</b>					
Serotyp 40	+	Serotyp 41	+		

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-08-14	Freigabeversion
2018-10-30	Generelle Überarbeitung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 8. Sammlung und Lagerung der Proben 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

## 16. Literatur

1. Cesario T. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Diseases* 2012, 55:107–113.
2. Sanchez J, *et al.* Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits-epidemiologic and immunologic risk factors in healthy young adults. *J Med Virol* 2001, 65:710–718.
3. Tate J, *et al.* Outbreak of severe disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US Air Force training facility. *J Infect Dis* 2009, 199:1419–1426.
4. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
5. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.



# RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus

**REF** PG1005

## 1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection of Adenovirus in human stool samples, throat rinsing fluid, sputum and bronchoalveolar lavage (BAL).

The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of respiratory infections caused by adenoviruses.

## 2. Summary and explanation of the test

Adenoviruses are non-enveloped ikosaedric double-stranded DNA (dsDNA) viruses and belong to the family of *Adenoviridae*. They were isolated from human pharyngeal tonsils (Adenoides), where their name originated from.<sup>1</sup> **One differentiates 56 serotypes of human adenoviruses and they are classified into seven groups (A - G).**<sup>4,5</sup> Adenoviruses cause a variety of different clinical pictures. Besides ocular and gastrointestinal infections, adenoviruses mostly cause respiratory disease. The latter one is primarily observed in small children under the age of four since they lack humoral immunity. However, 1 – 7 % of adult respiratory infections are caused by adenoviruses.<sup>1</sup> The symptoms of an adenovirus infection reach from cold, acute bronchitis to pneumonia and in immunocompromised patients, also acute respiratory distress syndrome (ARDS) is observed. Acute respiratory infections are mainly caused by serotypes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14 and 21, whereas serotypes 1, 2, 3, 4 and 7 are the major causes of pneumonia. Many adenoviruses are endemic with adenovirus outbreaks being often described on military bases.<sup>2</sup> In 2006/2007, a new adenovirus variant of serotype 14 lead to a major respiratory disease outbreak with a mortality rate of 5%.<sup>3</sup> The clinical picture of an adenovirus infection is also dependent on its viral entry to the host. Inhalation with adenovirus 7 leads to major infection of the lower respiratory tract but oral uptake of adenovirus 7, if at all, may only lead to mild infection. **The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus assay was developed as an aid in diagnosis of respiratory infections, although Adenovirus serotypes, which cause primarily gastrointestinal infections (serotype 40 and 41), can be detected from stool samples.**

### 3. Test principle

The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection of Adenovirus in human stool samples, throat rinsing fluid, sputum and bronchoalveolar lavage (BAL).

After DNA isolation, amplification of gene fragments (Hexon, if present) specific for Adenovirus occurs. The amplified target for Adenovirus is detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus assay contains an **Internal Control DNA** (ICD) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR-inhibition.

### 4. Reagents provided

**Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)**

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	<b>Reaction Mix</b>	2x	<b>1050 µl</b>	yellow
2	<b>Taq-Polymerase</b>	1x	<b>80 µl</b>	red
D	<b>Internal Control DNA</b>	2x	<b>1700 µl</b>	orange
N	<b>No Template Control</b>	1x	<b>450 µl</b>	white
P	<b>Positive Control</b>	1x	200 µl	blue

### 5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw and fully defrost reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).



## 6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

**Tab. 2** Necessary equipment

Extraction platforms	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Roche	MagNA Pure 96
Real-time PCR instruments	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 2.0, LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002) for use with the LightCycler<sup>®</sup> 2.0

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler<sup>®</sup> 480II

- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (BioScience grade, nuclease-free)

## 7. Precautions for users

For *in vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Collection and storage of samples

### 8.1 DNA preparation from stool samples

For DNA isolation of human stool samples, use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool samples before extraction 1:3 with water (or with S.T.A.R. Buffer if the MagNA Pure 96 is used). Vortex the diluted stool sample intensely and centrifuge at 1000 x g for 30 sec. Use from the supernatant the appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus assay contains an Internal Control DNA that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The Internal Control DNA can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the Internal Control DNA is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the Internal Control DNA should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the Internal Control DNA is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the Internal Control DNA has to be added during extraction procedure. The Internal Control DNA should always be added to the specimen-lysis buffer mixture

and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

## **8.2 DNA preparation from throat rinsing fluid, sputum and bronchoalveolar lavage (BAL)**

For DNA isolation of throat rinsing fluid, sputum and bronchoalveolar lavage (BAL), use a commercially available DNA isolation kit (e.g. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) or DNA extraction system (e.g. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Extract DNA according to the manufacturer's instructions.

The RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus assay contains an **Internal Control DNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control DNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control DNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control DNA** should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the **Internal Control DNA** is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control DNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control DNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

## 9. Test procedure

### 9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Taq-Polymerase**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control DNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

**Tab. 4:** Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICD only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Taq-Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
D	Internal Control DNA	1.0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

## 9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

**Negative control:** Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

**Note:** If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the negative control.

**Sample:** Add 5 µl DNA extract to the pre-pipetted Master-Mix.

**Positive control:** Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

**Note:** If the **Internal Control DNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control DNA** to the PCR-Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up see (Tab. 5, Tab. 6, Tab.7, Tab. 8).

### 9.3 PCR Instrument set-up

#### 9.3.1 DNA real-time PCR profile

**Tab. 5:** DNA real-time PCR profile for LightCycler® series and Rotor-Gene Q

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Note: Annealing and Extension occur in the same step.**

**Tab. 6:** DNA real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Note: Annealing and Extension occur in the same step.**

### 9.3.2 Universal real-time PCR profile

**Note:** The universal real-time PCR profile should only be used for DNA assays when combining RIDA<sup>®</sup> GENE DNA and RNA real-time PCR assays in one run.

**Tab. 7:** Universal real-time PCR profile for LightCycler<sup>®</sup> series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Note:** Annealing and Extension occur in the same step.

**Tab. 8:** Universal real-time PCR profile for Mx3005P, ABI7500, CFX96<sup>™</sup> and Rotor-Gene Q

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Note:** Annealing and Extension occur in the same step.

## 9.4 Detection channel set-up

**Tab. 9:** Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	Adenovirus	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	Adenovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Adenovirus	FAM	Check that reference dye is none
	ICD	HEX	
ABI 7500	Adenovirus	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Adenovirus	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Adenovirus	Green	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICD	Yellow	



## 10. Quality Control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Positive control and negative control have to show correct results (see Table 10, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of  $10^3$  copies/  $\mu\text{l}$ . In each PCR run it is used in a total amount of  $5 \times 10^3$  copies.

**Tab. 10:** For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA <sup>*1</sup>	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

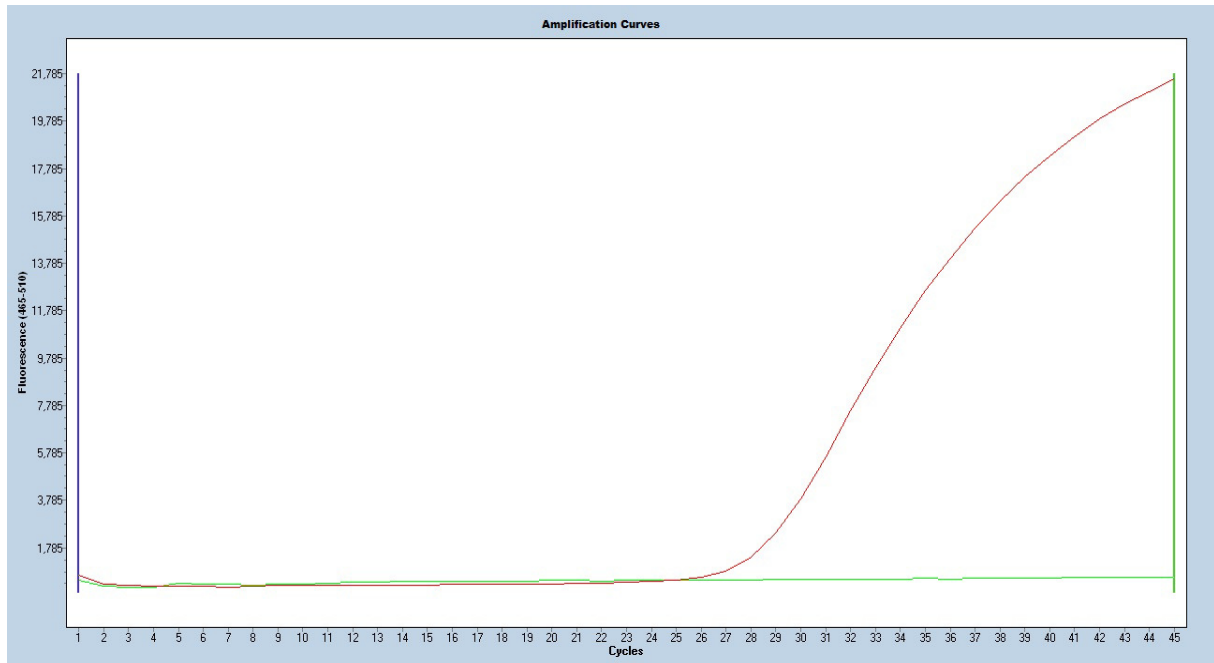
*\*1 No Ct value is required for the ICD to make a positive call for the positive control.*

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure



**Fig. 1:** Correct run of the positive control and negative control (Adenovirus) on the LightCycler® 480II

## 11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 11.

**Tab. 11:** Sample interpretation

Target genes		
Adenovirus	ICD	Result
positive	positive/negative	Adenovirus detected
negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	Invalid

Adenovirus is detected, if the sample DNA and the Internal Control DNA show an amplification signal in the detection system.

Adenovirus is also detected, if the sample DNA shows an amplification signal but none for the Internal Control DNA in the detection system. The detection of the internal amplification control is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control DNA.

Adenovirus is not detected, if the sample DNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control DNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control DNA.

A sample is invalid, if the sample DNA and Internal Control DNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor or a failure occurred in the extraction procedure. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

## 12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only suitable for human stool samples, throat rinsing fluid, sputum and BAL samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target gene (Hexon).

## 13. Performance characteristics

### 13.1 Clinical Performance

In a retrospective clinical validation study we analyzed 118 extracted respiratory specimens with the RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus assay and an in-house real-time PCR assay in an institute in Germany.

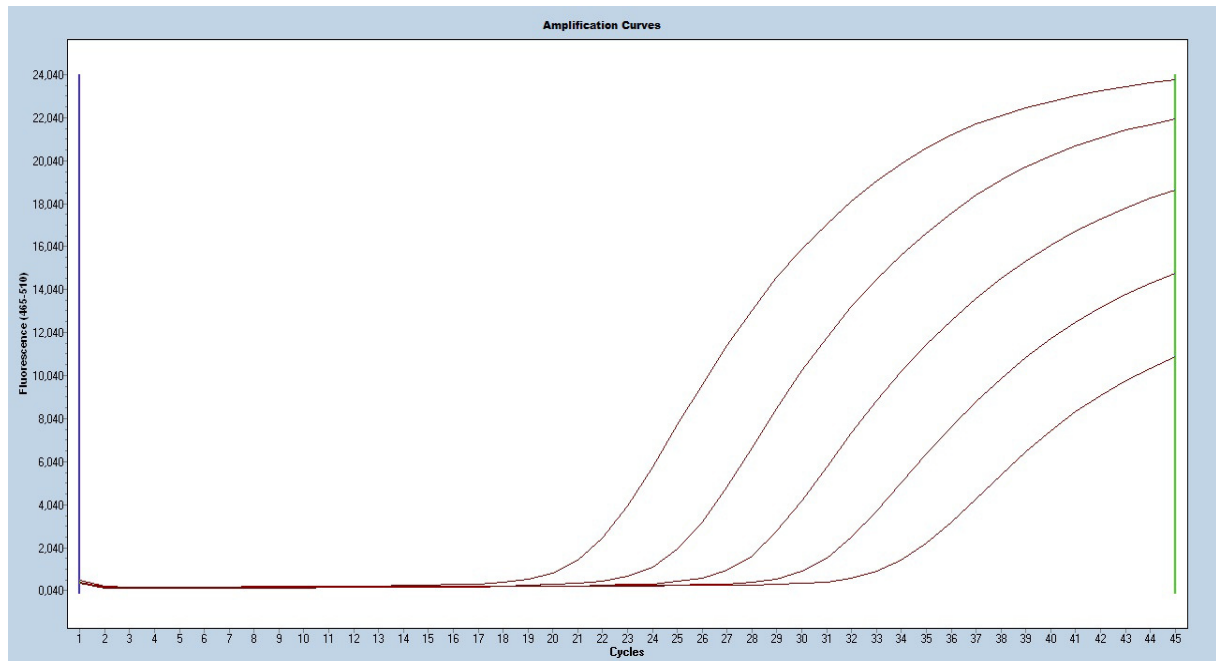
**Tab. 12:** Correlation of the Adenovirus results with the RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus real-time PCR and reference in-house real-time PCR

		In-house real-time PCR			
		Positive	Negative	Total	
RIDA <sup>®</sup> GENE Adenovirus	Positive	16	0	16	PPV: 100 %
	Negative	0	102	102	NPV: 100%
	Total	16	102	118	

## 13.2 Analytical sensitivity

The RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus multiplex real-time PCR has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction for Adenovirus.

The following figure 2 shows a dilution series Adenovirus ( $10^5$  -  $10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 2:** Dilution series Adenovirus ( $10^5$  –  $10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA extraction and DNA concentration.

### 13.3 Analytical specificity

The analytical specificity of the RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus multiplex real-time PCR is specific for Adenovirus. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 13):

**Tab. 13:** Cross-reactivity testing

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Coronavirus 229E, human	-	Norovirus GGII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Coxsackie virus B4, human	-	Parainfluenza virus 1 strain C35, human	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Cytomegalovirus, human	-	Parainfluenza virus 2 strain Greer, human	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Parainfluenza virus, serotype 3	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Parainfluenza virus 4b strain CH19503, human	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain Long	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>Fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Respiratory syncytial virus, human, strain 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>Lari</i>	-	Epstein-Barr-Virus B95-8 strain	-	Rhinovirus, human, Genogruppe A	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Herpes simplex virus 1 strain McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Clostridium bifermentas</i>	-	Herpes simplex virus 2 strain MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Influenza virus A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Metapneumovirus, human	-	Varicella Zoster Virus (Type B)	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.4 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR was evaluated against one serotype exemplary for each Adenovirus serogroup (see Tab. 14). All tested adenoviruses were detected by the RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus multiplex real-time PCR.

**Tab. 14:** Analytical reactivity testing










Adenovirus				
<b>Serogroup A</b>				
Serotype 31	+			
<b>Serogroup B</b>				
Serotype 7A	+	Serotype 11	+	
<b>Serogroup C</b>				
Serotype 1	+	Serotype 5	+	
<b>Serogroup D</b>				
Serotype 37	+			
<b>Serogroup E</b>				
Serotype 4	+			
<b>Serogroup F</b>				
Serotype 40	+	Serotype 41	+	

## 14. Version history

Version number	Chapter and designation
2014-08-14	Release version
2018-10-30	General revision 2. Summary and explanation of the test 4. Reagents provided 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 8. Collection and storage of samples 9. Test procedure 10. Quality Control 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

## 15. Explanation of symbols

### General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

### Testspecific symbols

Not applicable



## 16. Literature

1. Cesario T. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Diseases* 2012, 55:107–113.
2. Sanchez J, *et al.* Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits-epidemiologic and immunologic risk factors in healthy young adults. *J Med Virol* 2001, 65:710–718.
3. Tate J, *et al.* Outbreak of severe disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US Air Force training facility. *J Infect Dis* 2009, 199:1419–1426.
4. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
5. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.



# RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus

**REF** PG1005

## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de adenovirus en muestras de heces, secreciones traqueales, esputos y líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humanos.

El ensayo de PCR en tiempo real RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus está concebido como una ayuda para el diagnóstico de infecciones respiratorias provocadas por adenovirus.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

Los adenovirus son virus de ADN de doble cadena, icosaédricos, sin envoltura y pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Fueron aislados de anginas faríngeas humanas (adenoides), de donde se originó su nombre.<sup>1</sup> **Se pueden diferenciar 56 serotipos de adenovirus humanos, que se clasifican en siete grupos (A a G).**<sup>4,5</sup> Los adenovirus provocan una variedad de cuadros clínicos diferentes. Además de infecciones oculares y gastrointestinales, los adenovirus provocan enfermedades respiratorias principalmente. Estas últimas se observan fundamentalmente en niños menores a los cuatro años de edad, ya que carecen de inmunidad humoral. Sin embargo, del 1 % al 7 % de las infecciones respiratorias en adultos son provocadas por adenovirus.<sup>1</sup> Los síntomas de una infección por adenovirus varían desde gripe, bronquitis aguda a neumonía en pacientes inmunocomprometidos. También se observa el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Las infecciones respiratorias agudas son principalmente provocadas por los serotipos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14 y 21, mientras que los serotipos 1, 2, 3, 4 y 7 son las principales causas de neumonía. Muchos adenovirus son endémicos, y se suelen describir brotes de adenovirus en bases militares.<sup>2</sup> En el año 2006/2007, una nueva variación del serotipo 14 provocó un brote importante de enfermedad respiratoria con una tasa de mortalidad del 5 %.<sup>3</sup> El cuadro clínico de una infección por adenovirus también depende de su entrada viral en el huésped. La inhalación del adenovirus 7 provoca una infección mayor de las vías respiratorias inferiores, pero la ingesta oral del adenovirus 7, si acaso, puede originar solo una infección leve. **El ensayo RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus fue desarrollado como una ayuda en el diagnóstico de infecciones respiratorias, aún cuando los serotipos de adenovirus, que causan**

principalmente infecciones gastrointestinales (serotipos 40 y 41), pueden detectarse en muestras de heces.

### 3. Principio del ensayo

El RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de adenovirus en muestras de heces, secreciones traqueales, esputos y líquido de lavado broncoalveolar (LBA) humanos. Después del aislamiento del ADN, ocurre la amplificación de los fragmentos génicos (hexona, si está presente) específicos del adenovirus. La diana amplificada para adenovirus se detecta mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus contiene un **Internal Control DNA** (ICD) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

### 4. Reactivos suministrados

**Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)**

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rojo
D	Internal Control DNA	2x	1,700 µl	naranja
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

### 5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20°C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.

- Descongele con cuidado y por completo los reactivos antes de utilizarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de forma adecuada (2 - 8 °C).

## 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Adenovirus es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2** Equipamiento necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Roche	MagNA Pure 96
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

## 7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Preparación del ADN a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de aislamiento de ADN (como RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción (o con búfer S.T.A.R. si se usa el MagNA Pure 96). Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus contiene un Internal Control DNA que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El Internal Control DNA puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## **8.2 Preparación de ADN a partir de secreciones traqueales, esputos y líquido de lavado broncoalveolar (LBA).**

Para el aislamiento del ADN a partir de secreciones traqueales, esputos o lavado broncoalveolar, use un kit de aislamiento de ADN (p. ej. RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]). Extraiga el ADN siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control DNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control DNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl del **Internal Control DNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control DNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control DNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control DNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control DNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

**Tabla 3:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

**Tabla 4:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICD como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.



## 9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

**Control negativo:** Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control negativo.

**Muestra:** Agregue 5 µl de extracto de ADN a la mezcla maestra prepipeteada.

**Control positivo:** Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control DNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control DNA** a la mezcla para PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúgelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6, 7 y 8).

## 9.3 Configuración del equipo de PCR

### 9.3.1 Perfil de ADN por PCR en tiempo real

**Tabla 5:** Perfil de ADN por PCR en tiempo real para los equipos serie LightCycler® y Rotor-Gene Q

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

**Tabla 6:** Perfil de ADN por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500 y CFX96™

Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

### 9.3.2 Perfil universal por PCR en tiempo real

**Nota:** El perfil universal por PCR en tiempo real se debe usar en los ensayos de ADN solo cuando se combinan en una corrida los ensayos de ADN y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

**Tabla 7:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el equipo LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

**Tabla 8:** Perfil universal por PCR en tiempo real en el Mx3005P, ABI7500, CFX96™ y Rotor-Gene Q

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso.

## 9.4 Configuración del canal de detección

**Tabla 9:** Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	Adenovirus	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	Adenovirus	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Adenovirus	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICD	HEX	
ABI 7500	Adenovirus	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Adenovirus	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Adenovirus	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICD	Amarillo	

## 10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de  $10^3$  copias/  $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias.

**Tabla 10:** Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND * <sup>1</sup>	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

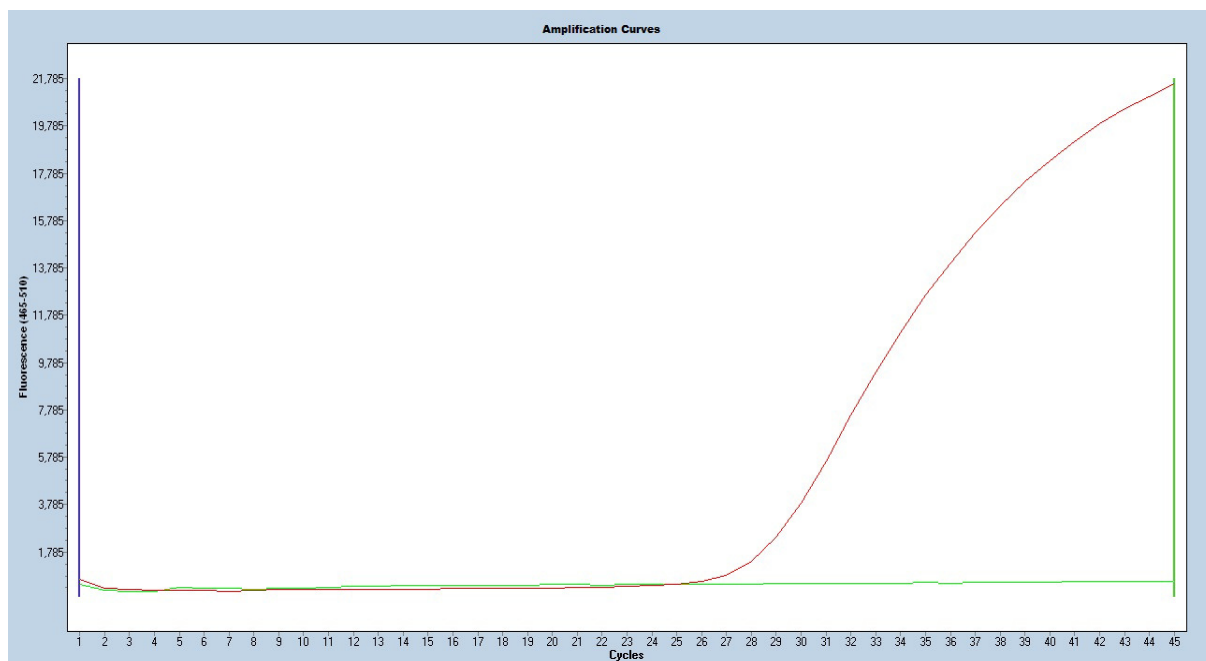
\*<sup>1</sup> No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo sea positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba



**Figura 1:** Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (adenovirus) en el LightCycler® 480II

## 11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 11.

**Tabla 11:** Interpretación de las muestras

Genes diana		
Adenovirus	ICD	Resultado
positivo	positivo/negativo	Adenovirus detectado
negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	No válido

Se detecta adenovirus si el ADN de la muestra y el **Internal Control DNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detecta adenovirus si hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero no del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La detección del control de amplificación interno no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control DNA** sea débil o esté ausente.

El adenovirus no se detecta si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ADN de la muestra ni del **Internal Control DNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR o se produjo un fallo en el procedimiento de extracción. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo es adecuado para muestras de heces humanas, secreciones traqueales, esputo y LBA:
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar la detección de nuevas variantes y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (hexona).

## 13. Características de rendimiento

### 13.1 Rendimiento clínico

En un estudio de validación clínica retrospectivo se analizaron 118 muestras respiratorias extraídas con el ensayo RIDA®GENE Adenovirus y con un ensayo de PCR en tiempo real interno, en un laboratorio en Alemania.

**Tabla 12:** Correlación de los resultados de adenovirus entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Adenovirus y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia

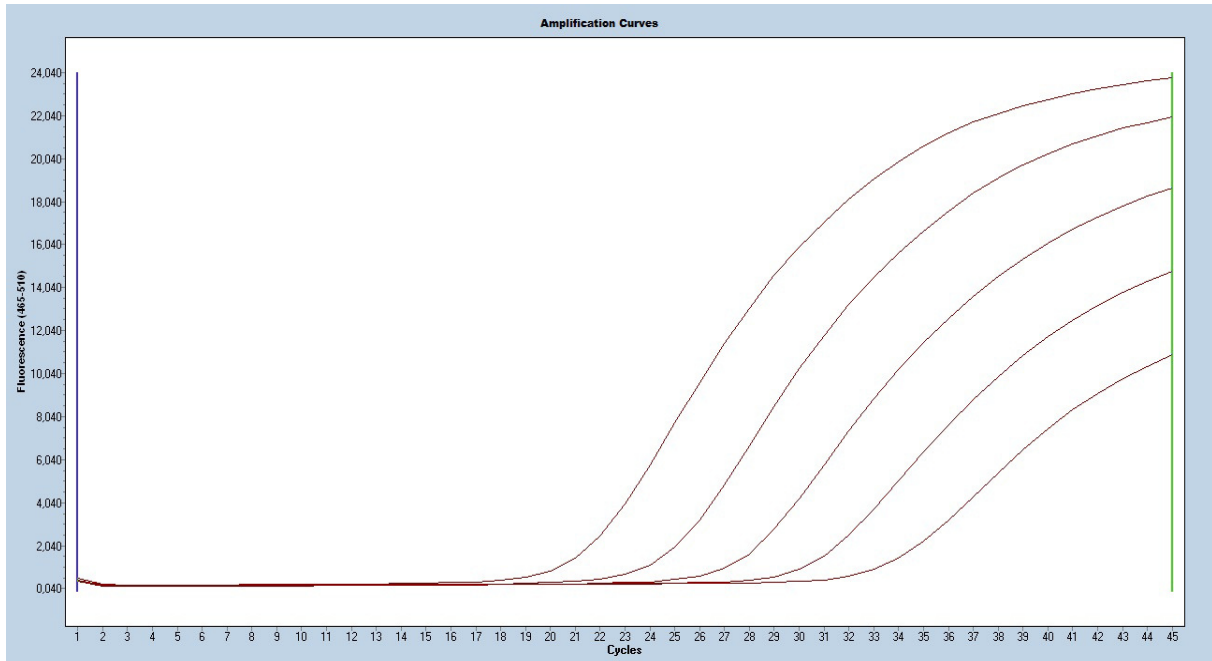
		Ensayo de PCR en tiempo real interno			
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Adenovirus	Positivo	16	0	16	PPV: 100 %
	Negativo	0	102	102	NPV: 100 %
	Total	16	102	118	



## 13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo multiplex de PCR en tiempo real RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de ADN por reacción para los adenovirus.

En la figura 2 se muestra una dilución seriada de adenovirus ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Figura 2:** Dilución seriada de adenovirus ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler<sup>®</sup> 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN y la concentración del ADN.

### 13.3 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Adenovirus es específica para los adenovirus. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 13):

**Tabla 13:** Ensayos de reactividad cruzada

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Coronavirus 229E, humano	-	Norovirus GGII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Virus coxsackie B4, humano	-	Virus de parainfluenza 1 cepa C35, humano	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Citomegalovirus, humano	-	Virus de parainfluenza 2, cepa Greer, humano	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Virus paragripal, serotipo 3	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Virus de parainfluenza 4b cepa CH19503, humano	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus sincicial respiratorio, humano, cepa Long	-
<i>Campylobacter fetus</i> subesp. <i>fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Virus sincicial respiratorio, humano, cepa 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> subesp. <i>lari</i>	-	Virus Epstein-Barr, cepa B95-8	-	Rinovirus, humano, genogrupo A	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Virus del herpes simple 1, cepa McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Clostridium bifermentas</i>	-	Virus del herpes simple 2, cepa MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Virus de la gripe A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Metaneumovirus, humano	-	Virus de la varicela-zóster (tipo B)	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.4 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Adenovirus se evaluó en comparación con un ejemplo de serotipo por cada serogrupo de adenovirus (consulte la tabla 14). Todos los adenovirus evaluados se detectaron con el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Adenovirus.

**Tabla 14:** Pruebas de reactividad analítica










Adenovirus				
<b>Serogrupo A</b>				
Serotipo 31	+			
<b>Serogrupo B</b>				
Serotipo 7A	+	Serotipo 11	+	
<b>Serogrupo C</b>				
Serotipo 1	+	Serotipo 5	+	
<b>Serogrupo D</b>				
Serotipo 37	+			
<b>Serogrupo E</b>				
Serotipo 4	+			
<b>Serogrupo F</b>				
Serotipo 40	+	Serotipo 41	+	

## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2014-08-14	Versión de lanzamiento
2018-10-30	Revisión general 2. Resumen y descripción del ensayo 4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 8. Obtención y almacenamiento de muestras 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

## 15. Explicación de los símbolos

### Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

## 16. Bibliografía

1. Cesario T. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Diseases* 2012, 55:107–113.
2. Sanchez J, *et al.* Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits-epidemiologic and immunologic risk factors in healthy young adults. *J Med Virol* 2001, 65:710–718.
3. Tate J, *et al.* Outbreak of severe disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US Air Force training facility. *J Infect Dis* 2009, 199:1419–1426.
4. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
5. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.



# **RIDA® GENE Adenovirus**

**REF** PG1005

## **1. Application**

Pour le diagnostic *in vitro*. RIDA® GENE Adenovirus est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'adénovirus dans des échantillons de selles humaines, de liquide de rinçage de gorge, de crachats et de lavage broncho-alvéolaire (LBA).

Le test de PCR en temps réel RIDA® GENE Adenovirus est destiné à faciliter le diagnostic des infections respiratoires provoquées par les adénovirus.

## **2. Résumé et explication du test**

Les adénovirus sont des virus icosaédriques non enveloppés à ADN double brin (ADNdb) appartenant à la famille des *Adenoviridae*. Ils ont été isolés dans les amygdales pharyngiennes humaines (végétations adénoïdes), d'où leur nom<sup>1</sup>. **On distingue 56 sérotypes d'adénovirus humains, classés en sept groupes (A à G)<sup>4,5</sup>.**

Les adénovirus sont à l'origine de toute une série de tableaux cliniques. En dehors des infections oculaires et gastro-intestinales, les adénovirus induisent avant tout des maladies respiratoires, principalement observées chez les enfants de moins de quatre ans dont l'immunité humorale n'est pas encore développée. Toutefois, 1 à 7 % des infections respiratoires de l'adulte sont également dues à des adénovirus<sup>1</sup>. Les symptômes des infections par adénovirus vont du simple rhume à la bronchite aiguë en passant par la pneumonie ; chez les patients immunodéprimés, on observe également un syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA). Les infections respiratoires aiguës sont principalement provoquées par les sérotypes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14 et 21, tandis que les pneumonies sont généralement occasionnées par les sérotypes 1, 2, 3, 4 et 7. Parmi les adénovirus, beaucoup sont endémiques et sont à l'origine de foyers souvent observés sur les bases militaires<sup>2</sup>. En 2006/2007, une nouvelle variante d'adénovirus de sérotype 14 a provoqué une grave flambée de maladies respiratoires ayant entraîné un taux de mortalité de 5 %<sup>3</sup>. Le tableau clinique d'une infection par adénovirus dépend également de la voie utilisée par le virus pour infecter son hôte. Par inhalation, l'adénovirus 7 entraîne une grave infection des voies respiratoires inférieures, tandis qu'en cas d'ingestion, il peut n'entraîner qu'une légère infection. **Le test RIDA® GENE Adenovirus a été mis au point pour faciliter le diagnostic des infections respiratoires, bien que les adénovirus**

impliqués dans les infections gastro-intestinales (sérotypes 40 et 41) puissent être détectés à partir d'un simple échantillon de selles.

### 3. Principe du test

RIDA® GENE Adenovirus est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'adénovirus dans des échantillons de selles humaines, de liquide de rinçage de gorge, de crachats et de lavage broncho-alvéolaire (LBA).

Après isolation de l'ADN, les fragments de gène (hexon, si présent) spécifiques aux adénovirus sont amplifiés. Pour l'adénovirus, la cible amplifiée est détectée grâce à des sondes d'hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la **Taq-Polymerase** rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA® GENE Adenovirus contient un **Internal Control DNA** (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

### 4. Contenu du paquet

**Tableau 1 :** Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rouge
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).



- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

**Tableau 2 : Matériel nécessaire**

Plateformes d'extraction	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Roche	MagNA Pure 96
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 2.0, LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 <sup>™</sup>
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler<sup>®</sup> 2.0
- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler<sup>®</sup> 480II
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (qualité BioScience, sans nucléase)

## 7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3 (ou un tampon S.T.A.R. en cas d'utilisation du MagNA Pure 96). Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus inclut un Internal Control DNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne Internal Control DNA peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le contrôle **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction. Le contrôle **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de contrôle **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

## **8.2 Préparation de l'ADN à partir de liquide de rinçage de gorge, de crachats et de lavage broncho-alvéolaire (LBA)**

Pour isoler l'ADN du liquide de rinçage de gorge, des crachats ou du lavage broncho-alvéolaire (LBA), utiliser un kit d'isolation d'ADN (par ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus inclut un **Internal Control DNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si le contrôle **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction. Le contrôle **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de contrôle **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3 et 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement les réactifs **Reaction Mix** , **Taq-Polymerase** , **Positive Control** , **No Template Control** et **Internal Control DNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

**Tableau 3 :** Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

**Tableau 4 :** Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICD uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

**Contrôle négatif :** Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

**Échantillon :** Ajouter 5 µl d'extrait d'ADN au mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif :** Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque :** si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6, 7 et 8).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

### 9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

**Tableau 5** : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

**Remarque** : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

**Tableau 6** : Profil de PCR en temps réel de l'ADN pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

**Remarque** : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

**Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel RIDA® GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.**

**Tableau 7 :** Profil universel de PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

**Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.**

**Tableau 8 :** Profil universel de PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, CFX96™ et Rotor-Gene Q

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

**Remarque : l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.**

## 9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 9 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	Adénovirus	530	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	Adénovirus	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Adénovirus	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
ABI 7500	Adénovirus	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Adénovirus	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Adénovirus	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	



## 10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 10, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/  $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies de contrôle positif.

**Tableau 10** : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O * <sup>1</sup>	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

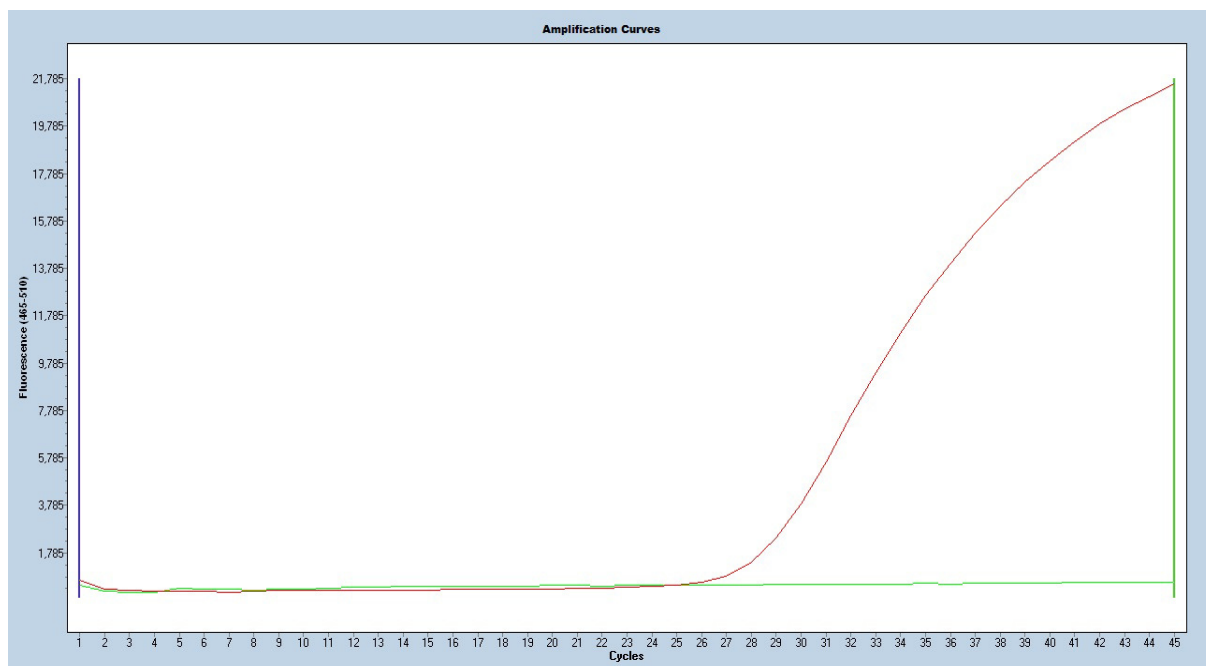
\*<sup>1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



**Figure 1 :** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (adénovirus) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11 :** Interprétation des échantillons

Gènes cibles		
Adénovirus	ICD	Résultat
positif	positif/négatif	Détection d'adénovirus
négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	Non valide

L'adénovirus est détecté si l'ADN de l'échantillon et le contrôle **Internal Control DNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

L'adénovirus est également détecté si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le contrôle **Internal Control DNA**. La détection du contrôle d'amplification interne n'est pas nécessaire, car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent de l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA**.

L'adénovirus n'est pas détecté si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le

contrôle **Internal Control DNA** . Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du contrôle **Internal Control DNA** .

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN du contrôle interne **Internal Control DNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR ou la procédure d'extraction est défectueuse. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

## **12. Limites de la méthode**

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est uniquement adapté aux échantillons de selles humaines et aux échantillons de liquide de rinçage de gorge, de crachats et de LBA.
3. Les prélèvements, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible (hexon).

## 13. Performances

### 13.1 Performance clinique

Dans une étude de validation clinique rétrospective, 118 spécimens extraits à l'aide du test RIDA®GENE Adenovirus et d'un test de PCR en temps réel interne ont été analysés par un institut situé en Allemagne.

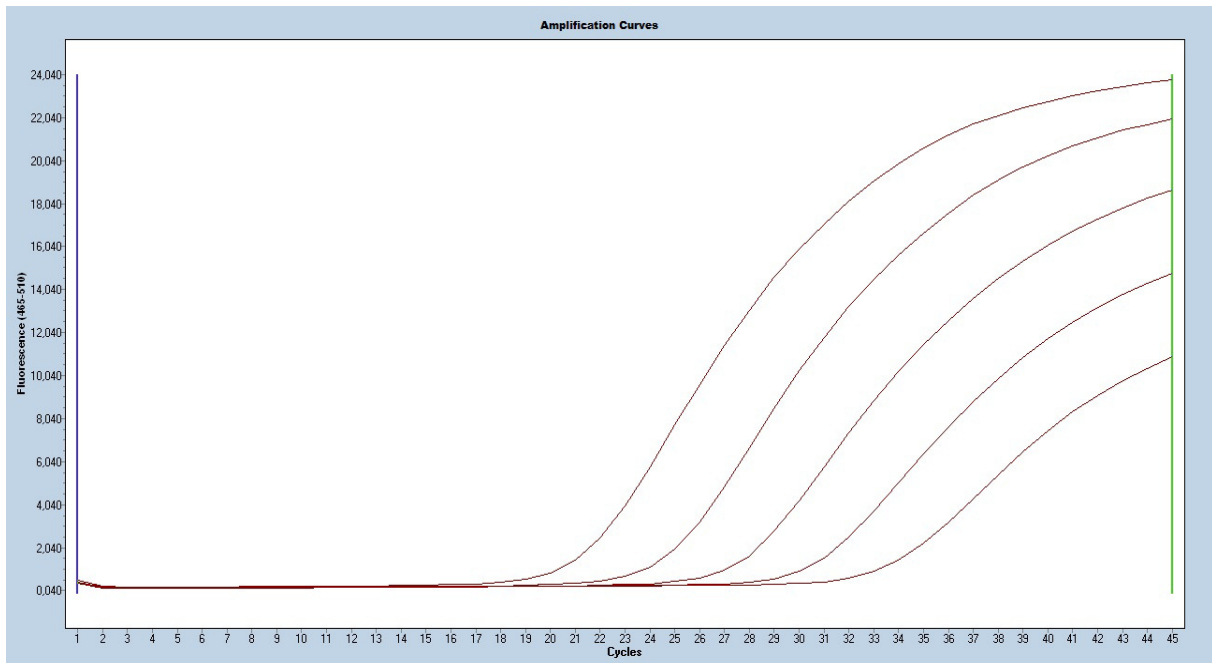
**Tableau 12** : Corrélation des résultats d'analyse des adénovirus obtenus avec le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Adenovirus et de la PCR en temps réel interne de référence

		PCR en temps réel interne			
		Positif	Négatif	Total	
RIDA®GENE Adenovirus	Positif	16	0	16	VPP : 100 %
	Négatif	0	102	102	VPN : 100 %
	Total	16	102	118	

## 13.2 Sensibilité analytique

Pour l'adénovirus, la limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus est  $\geq 10$  copies d'ADN par réaction.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions d'adénovirus ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 2 :** Série de dilutions pour les adénovirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN et de la concentration de l'ADN.

### 13.3 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus concerne les adénovirus. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 13) :

**Tableau 13** : Test de la réactivité croisée

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Coronavirus 229E, humain	-	Norovirus GGII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Virus Coxsackie B4, humain	-	Virus parainfluenza 1 souche C35, humain	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Cytomégalovirus, humain	-	Virus parainfluenza 2 souche Greer, humain	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Virus parainfluenza 4b souche CH19503, humain	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> sous-esp. <i>lari</i>	-	Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-	Rhinovirus, humain, génogroupe A	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	Virus Herpes simplex 2 souche MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Virus de la grippe A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> sous-esp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> sous-esp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Métapneumovirus, humain	-	Virus varicelle-zona (type B)	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus a été évaluée par rapport à un exemplaire de sérotype pour chaque sérogroupe d'adénovirus (voir tableau 14). Tous les adénovirus testés ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus.

**Tableau 14** : Test de la réactivité analytique










Adénovirus				
<b>Sérogroupe A</b>				
Sérotype 31	+			
<b>Sérogroupe B</b>				
Sérotype 7A	+	Sérotype 11	+	
<b>Sérogroupe C</b>				
Sérotype 1	+	Sérotype 5	+	
<b>Sérogroupe D</b>				
Sérotype 37	+			
<b>Sérogroupe E</b>				
Sérotype 4	+			
<b>Sérogroupe F</b>				
Sérotype 40	+	Sérotype 41	+	

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2014-08-14	Version de la publication
2018-10-30	Révision générale 2. Résumé et explication du test 4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>in vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques au test

Sans objet



## 16. Bibliographie

1. Cesario T. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Diseases* 2012, 55:107–113.
2. Sanchez J, *et al.* Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits-epidemiologic and immunologic risk factors in healthy young adults. *J Med Virol* 2001, 65:710–718.
3. Tate J, *et al.* Outbreak of severe disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US Air Force training facility. *J Infect Dis* 2009, 199:1419–1426.
4. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
5. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.



# RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus

**REF** PG1005

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus è un test di PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta dell'Adenovirus in campioni di feci, fluido di lavaggio faringeo, espettorato e fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) umani.

Il test di PCR real-time RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus è adatto come ausilio nella diagnosi delle infezioni respiratorie causate da Adenovirus.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

Gli Adenovirus sono virus a DNA a doppio filamento (dsDNA) non rivestiti, icosaedrici, appartenenti alla famiglia *Adenoviridae*. Sono stati isolati dalle tonsille faringee umane (adenoidi), da cui origina il loro nome.<sup>1</sup> **Si distinguono 56 sierotipi di adenovirus umano, classificati in sette gruppi (A – G).**<sup>4,5</sup> Gli Adenovirus sono responsabili di diversi quadri clinici. Oltre a infezioni oculari e gastrointestinali, gli Adenovirus causano prevalentemente malattie respiratorie. Queste ultime si osservano principalmente nei bambini di età inferiore ai quattro anni, data la mancanza di risposta immunitaria umorale. Tuttavia, dall'1 al 7% delle infezioni respiratorie dell'adulto sono provocate da Adenovirus.<sup>1</sup> I sintomi di un'infezione da Adenovirus comprendono raffreddore, bronchite acuta, fino ad arrivare alla polmonite; nei pazienti immunocompromessi si osserva anche sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS). Le infezioni respiratorie acute sono causate principalmente dai sierotipi 1, 2, 3, 4, 6, 7, 14 e 21, mentre i sierotipi 1, 2, 3, 4 e 7 sono le principali cause della polmonite. Molti Adenovirus sono endemici; spesso si segnalano epidemie di infezioni da Adenovirus nelle basi militari.<sup>2</sup> Nel 2006/2007, una nuova variante del sierotipo 14 ha portato a una diffusa epidemia di malattie respiratorie con un tasso di mortalità del 5%.<sup>3</sup> Il quadro clinico dell'infezione da Adenovirus dipende anche dalla via di ingresso del virus nell'organismo ospite. L'inalazione di Adenovirus 7 determina infezioni più serie delle vie respiratorie inferiori, mentre il contatto per via orale con lo stesso sierotipo determina solo infezioni lievi, e non sempre. **Il test RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus è stato sviluppato come ausilio nella diagnosi delle infezioni respiratorie, sebbene i sierotipi che causano principalmente infezioni gastrointestinali (sierotipo 40 e 41) possano essere individuati nei campioni di feci.**

### 3. Principio del test

RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus è un test di PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta dell'Adenovirus in campioni di feci, fluido di lavaggio faringeo, espettorato e fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL) umani.

Dopo l'isolamento del DNA viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici (esone, se presente) specifici per l'Adenovirus. Il target amplificato per l'Adenovirus viene rilevato con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la Taq-Polymerase rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus contiene un Internal Control DNA (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione del campione e/o per determinare la possibile inibizione della PCR.

### 4. Contenuto della confezione

**Tabella 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	rosso
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	arancione
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

### 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongellare i reagenti con cura e completamente prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongellamento senza compromettere i test (ad esempio, dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongellare immediatamente).

- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

## 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Adenovirus è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Roche	MagNA Pure 96
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Avvertenze:** sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler® 2.0
- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi)

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione di campioni

### 8.1 Preparazione del DNA da campioni di feci

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane utilizzare un kit (ad es. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni di feci in rapporto 1:3 con acqua (o con tampone S.T.A.R. se viene usato il MagNA Pure 96). Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 secondi. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus contiene un Internal Control DNA che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia stata sufficiente. L' Internal Control DNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l' Internal Control DNA viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di Internal Control DNA alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l' Internal Control DNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di Internal Control DNA durante la procedura di estrazione.

L' **Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## **8.2 Preparazione del DNA da fluido di lavaggio faringeo, espettorato e fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL)**

Per l'isolamento del DNA da fluido di lavaggio faringeo, espettorato e fluido di lavaggio broncoalveolare (BAL), utilizzare un kit di isolamento del DNA (ad es. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione del DNA (ad es. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)) disponibili in commercio. Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia stata sufficiente. L' **Internal Control DNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l' **Internal Control DNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control DNA** durante la procedura di estrazione.

L' **Internal Control DNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10% a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tabella 3, Tabella 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l' **Internal Control DNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 - 8 °C).

**Tabella 3:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

**Tabella 4:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICD solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Taq-Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.



## 9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

**Controllo negativo:** dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo negativo.

**Campione:** dispensare 5 µl di estratto di DNA alla Master Mix pre-pipettata.

**Controllo positivo:** dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l' **Internal Control DNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control DNA** alla PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione di PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6, Tabella 7, Tabella 8).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo PCR real-time per DNA

**Tabella 5:** Profilo della PCR real-time del DNA per le serie LightCycler® e Rotor-Gene Q

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tabella 6:** Profilo della PCR real-time del DNA per Mx3005P, ABI7500, CFX96™

Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

### 9.3.2 Profilo PCR real-time universale

**Avvertenze:** il profilo per PCR real-time universale deve essere utilizzato per i test del DNA solo quando i test di PCR real-time RIDA® GENE DNA e RNA vengono effettuati in un unico ciclo.

**Tabella 7:** Profilo PCR real-time universale per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tabella 8:** Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI7500, CFX96™ e Rotor-Gene Q

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

## 9.4 Impostazione del canale di rivelazione

**Tabella 9:** Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 2.0	Adenovirus	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICD	560	
Roche LightCycler® 480II	Adenovirus	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICD	533/580	
Agilent Techn. Mx3005P	Adenovirus	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICD	HEX	
ABI 7500	Adenovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICD	VIC	
Bio-Rad CFX96™	Adenovirus	FAM	-
	ICD	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Adenovirus	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICD	Giallo	

## 10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 10, Fig. 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di  $10^3$  copie/  $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tabella 10:** Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA * <sup>1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

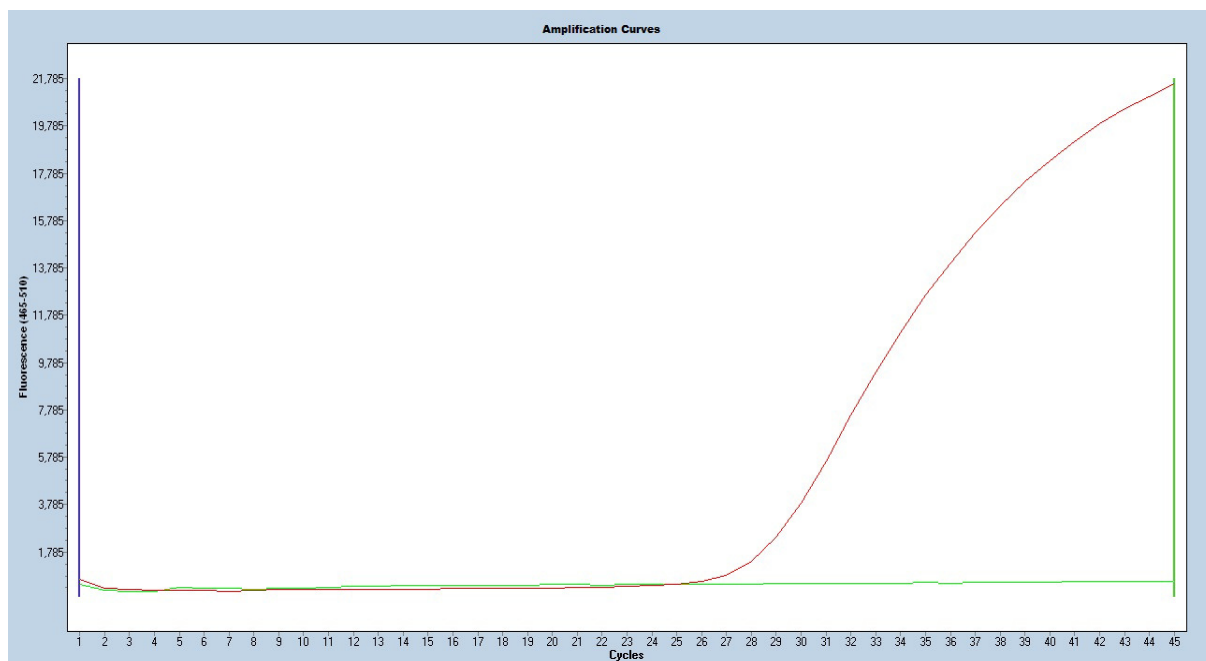
\*<sup>1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Fig. 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Adenovirus) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Geni target		
Adenovirus	ICD	Risultato
positivo	positivo/negativo	Adenovirus rivelato
negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	Non valido

L'Adenovirus è comprovabile se sia il DNA del campione sia l' **Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

L'Adenovirus è inoltre comprovabile se il DNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l' **Internal Control DNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione del controllo di amplificazione interno non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell' **Internal Control DNA** sia debole o assente.

L'Adenovirus non è comprovabile se il DNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'

**Internal Control DNA** nel sistema di rilevazione. La rivelazione dell'  
**Internal Control DNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né il DNA del campione né l'**Internal Control DNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rilevazione. In questo caso il campione contiene un inibitore della PCR o si è verificato un errore nella procedura di estrazione. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## **12. Limiti del metodo**

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è idoneo solo per campioni di feci, liquido di lavaggio faringeo, espettorato e BAL umani.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (esone).

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio retrospettivo di validazione clinica condotto presso un istituto in Germania abbiamo analizzato 118 campioni respiratori umani con il test RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus e con un test di PCR real-time interno.

**Tabella 12:** Confronto tra i risultati relativi all'Adenovirus con il test RIDA<sup>®</sup>GENE Adenovirus e con il test di PCR real-time interno di riferimento

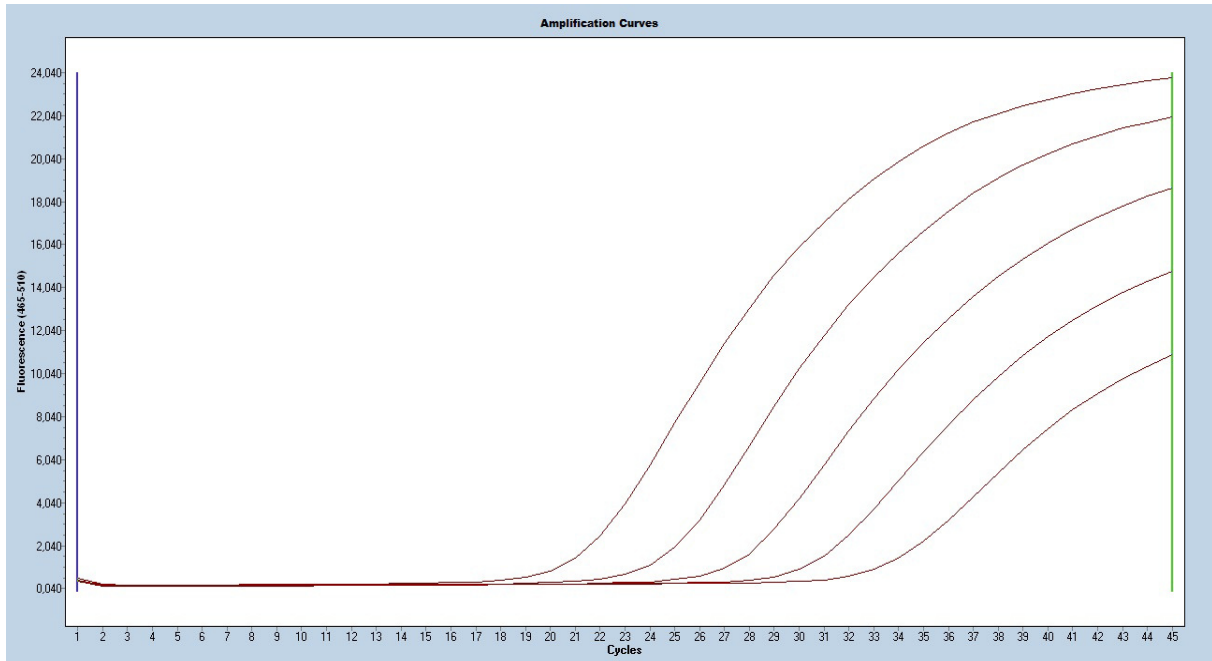
		Test di PCR real-time interno			
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA <sup>®</sup> GENE Adenovirus	Positivo	16	0	16	PPV: 100%
	Negativo	0	102	102	NPV: 100%
	Totale	16	102	118	



### 13.2 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus ha un limite di rivelazione maggiore o uguale a 10 copie di DNA per reazione per Adenovirus.

La figura 2 seguente mostra una serie di diluizioni di Adenovirus ( $10^5$  -  $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) su LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 2:** Serie di diluizione dell'Adenovirus ( $10^5$  –  $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II

Il limite di rivelabilità dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA e dalla concentrazione del DNA.

### 13.3 Specificità analitica

La specificità analitica del test RIDA® GENE Adenovirus di PCR real-time multiplex è specifica per l'Adenovirus. Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 13):

**Tabella 13:** Test di reattività crociata

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Coronavirus 229E, umano	-	Norovirus GGII	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Virus Coxsackie B4, umano	-	Virus parainfluenzale 1, ceppo C35, umano	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	Cytomegalovirus, umano	-	Virus parainfluenzale 2, ceppo Greer, umano	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Virus parainfluenzale 4b, ceppo CH19503, umano	-
<i>Bordetella parapertussis</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	-
<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>Fetus</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	-
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>Lari</i>	-	Virus Epstein Barr, ceppo B95-8	-	Rinovirus, umano, genogruppo A	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clone C6	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Clostridium bifermentas</i>	-	Virus dell'herpes simplex 2 ceppo MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	Virus dell'influenza A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. <i>Pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> sottosp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Metapneumovirus, umano	-	Virus Varicella Zoster (tipo B)	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.4 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus è stata valutata rispetto a un esemplare di sierotipo per ogni sierogruppo di Adenovirus (vedere Tabella 14). Tutti gli Adenovirus testati sono stati rivelati dal test di PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE Adenovirus.

**Tabella 14:** Test di reattività analitica










Adenovirus				
<b>Sierogruppo A</b>				
Sierotipo 31	+			
<b>Sierogruppo B</b>				
Sierotipo 7A	+	Sierotipo 11	+	
<b>Sierogruppo C</b>				
Sierotipo 1	+	Sierotipo 5	+	
<b>Sierogruppo D</b>				
Sierotipo 37	+			
<b>Sierogruppo E</b>				
Sierotipo 4	+			
<b>Sierogruppo F</b>				
Sierotipo 40	+	Sierotipo 41	+	

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2014-08-14	Versione di rilascio
2018-10-30	Revisione generale 2. Sintesi e spiegazione del test 4. Contenuto della confezione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 8. Raccolta e conservazione di campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

### Simboli specifici nel test

Non pertinente

## 16. Bibliografia

1. Cesario T. Viruses associated with pneumonia in adults. *Clin Infect Diseases* 2012, 55:107–113.
2. Sanchez J, *et al.* Epidemic of adenovirus-induced respiratory illness among US military recruits-epidemiologic and immunologic risk factors in healthy young adults. *J Med Virol* 2001, 65:710–718.
3. Tate J, *et al.* Outbreak of severe disease associated with emergent human adenovirus serotype 14 at a US Air Force training facility. *J Infect Dis* 2009, 199:1419–1426.
4. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
5. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.