

RIDA® GENE EHEC/EPEC

REF PG2205



1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA[®]GENE EHEC/EPEC est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des gènes codant pour les facteurs de virulence d'ECEH, STEC, ECEP, ECEI/*Shigella* spp. dans des échantillons et des cultures de selles humaines^{1,2}.

Le test de PCR en temps réel RIDA[®]GENE EHEC/EPEC est destiné à faciliter le diagnostic de la gastro-entérite provoquée par des *Escherichia coli* et *Shigella* spp. pathogènes, respectivement.

2. Résumé et explication du test

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) sont des bactéries à Gram négatif et facultativement anaérobies en forme de bâtonnet qui se déplacent par flagellation péritriche. Elles appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Les *E. coli* font normalement partie de la flore intestinale des humains et de nombreux animaux d'élevage. Ils ne sont généralement pas pathogènes. Certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes pour les humains par acquisition de certains facteurs de virulence (par ex., des gènes codant pour des toxines).

Les six agents pathogènes connus d'*E. coli* dans l'intestin sont : *E. coli* entérohémorragique (ECEH), *E. coli* entéro-pathogène (ECEP), *E. coli* entérotoxigène (ECET), *E. coli* entéro-invasif (ECEI), *E. coli* entéro-agrégatif (ECEA) et *E. coli* à adhésion diffuse (ECAD) et ils peuvent être différenciés par les facteurs de virulence³. Les *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) sont actuellement les *E. coli* pathogènes les plus importants dans l'intestin. Chaque année, environ 1 000 cas de maladies dues à une infection par *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) sont signalés en Allemagne. Les ECEH sont un sous-groupe des *E. coli* produisant des toxines de Shiga (STEC) ou des vérotoxines (VTEC) et ils ont la capacité de produire deux cytotoxines, les vérotoxines 1 et 2. En raison de la ressemblance entre les vérotoxines et les shigatoxines de *Shigella dysenteriae*, les VTEC sont aussi dénommées STEC. Un autre facteur de virulence important pour le diagnostic pour les ECEH est le gène *eae* (gène attachant-éfaçant d'*E. coli*) codant l'intimine. La détection du gène *ipaH* (gène H de l'antigène du plasmide d'invasivité) permet de différencier les ECEH/STEC des *Shigella*/ECEI.

Les symptômes cliniques déclenchés par les ECEH vont de la diarrhée légère à la gastro-entérite sévère en passant par la colite hémorragique et surviennent dans environ 10 à 20 % des cas d'infection. Avec 5 à 10 % des infections, chez les bébés et les enfants en bas âge en particulier ainsi que chez les patients âgés ou ceux dont le système immunitaire est affaibli, cela peut également entraîner un syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) en tant que complication post-infectieuse mettant en danger la vie du patient. Avec le SHU et le PPT, le taux de mortalité est particulièrement élevé chez les enfants (environ 10 à 15 %). Des insuffisances rénales aiguës peuvent se produire avec nécessité temporaire de dialyse ou perte irréversible de la fonction rénale entraînant un besoin

constant de dialyse. L'intensité du tableau clinique dépend de la prédisposition du patient, mais également du phénotype d'ECEH correspondant ; cela signifie que la progression de la maladie dépend également des différentes façons dont les facteurs de virulence s'expriment. Des facteurs, encore inconnus de nos jours, jouent également un rôle. La durée de la période d'incubation est environ de 2 à 10 jours. À cause de la forte résistance environnementale, la dose infectieuse d'ECEH est uniquement d'environ 100 organismes. Les sources d'infection sont les aliments contaminés provenant des espèces bovines, ovines ou caprines, en particulier la viande crue ou des produits à base de viande qui n'ont pas été suffisamment chauffés, le lait cru non pasteurisé ou certifié et les fruits et légumes contaminés. Les chaînes infectieuses d'homme à homme, en particulier dans les structures collectives comme les crèches, résidences pour personnes âgées ou hôpitaux, ainsi que les contacts directs avec des animaux sont également importants^{4,5}.

L'*E. coli* entéropathogène (ECEP) provoque des diarrhées, en particulier chez les enfants de moins de 2 ans. Le facteur de virulence pour l'ECEP est également le gène *eae*⁴.

3. Principe du test

Le test RIDA[®]GENE EHEC/EPEC est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des gènes codant pour les facteurs de virulence d'ECEH, STEC, ECEP, ECEI/*Shigella* spp.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification des fragments de gène spécifiques aux facteurs de virulence *stx1/stx2*, *eae* et *ipaH* (si présents). Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour 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 EHEC/EPEC contient un **Internal Control DNA** (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et 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 réactions)

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 indiquée. 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 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 RIDA[®] GENE EHEC/EPEC 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 [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS [®] easyMAG [®]
Roche	MagNA Pure
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
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.

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler[®] 480II et le LightCycler[®] 480 z
- 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 (eau de 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

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon 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® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell® 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. 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® GENE EHEC/EPEC 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. Le 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 le 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 **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'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. Le **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 **Internal Control DNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

8.2 Préparation des échantillons à partir des cultures

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

Pour isoler l'ADN de la culture, il est recommandé de suivre la procédure suivante : Ajouter 1 ml d'eau de PCR dans un tube de préparation. Recueillir les colonies à l'aide d'une anse de prélèvement et les suspendre dans l'eau de PCR préparée. Couper ou casser la tige de l'anse de prélèvement. Fermer hermétiquement le tube de préparation et l'agiter vigoureusement pendant 60 secondes. Chauffer et agiter le tube de préparation à 95 °C pendant 10 min dans un bloc chauffant. Centrifuger pendant 1 min à 13 000 x g et recueillir le surnageant en tant qu'échantillon.

Remarque : en présence d'une forte turbidité, recommencer l'étape de centrifugation (si nécessaire).

Le test RIDA[®] GENE EHEC/EPEC 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 **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'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. L'ADN de contrôle interne **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 d'ADN de contrôle interne **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, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le [Reaction Mix], la [Taq-Polymerase], le [Positive Control], le [No Template Control] et le [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
	Total	20 µl	220 µl

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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

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 (tableaux 5, 6, 7, 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 de température / Vitesse de montée	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, ABI 7500 et 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 de température / Vitesse de montée	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, ABI 7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<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® 480II	stx1/stx2	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
	ipaH	533/610	
	eae	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	stx1/stx2	465/510	Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
	ipaH	540/610	
	eae	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	stx1/stx2	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
ABI 7500	stx1/stx2	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	stx1/stx2	FAM	-
	ICD	VIC	
	ipaH	ROX	
	eae	Cy5	
Qiagen Rotor-GENE Q	stx1/stx2	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	
	ipaH	Orange	
	eae	Rouge	

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, figures 1, 2 et 3) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 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 ^{*1}	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

^{*1} Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR 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

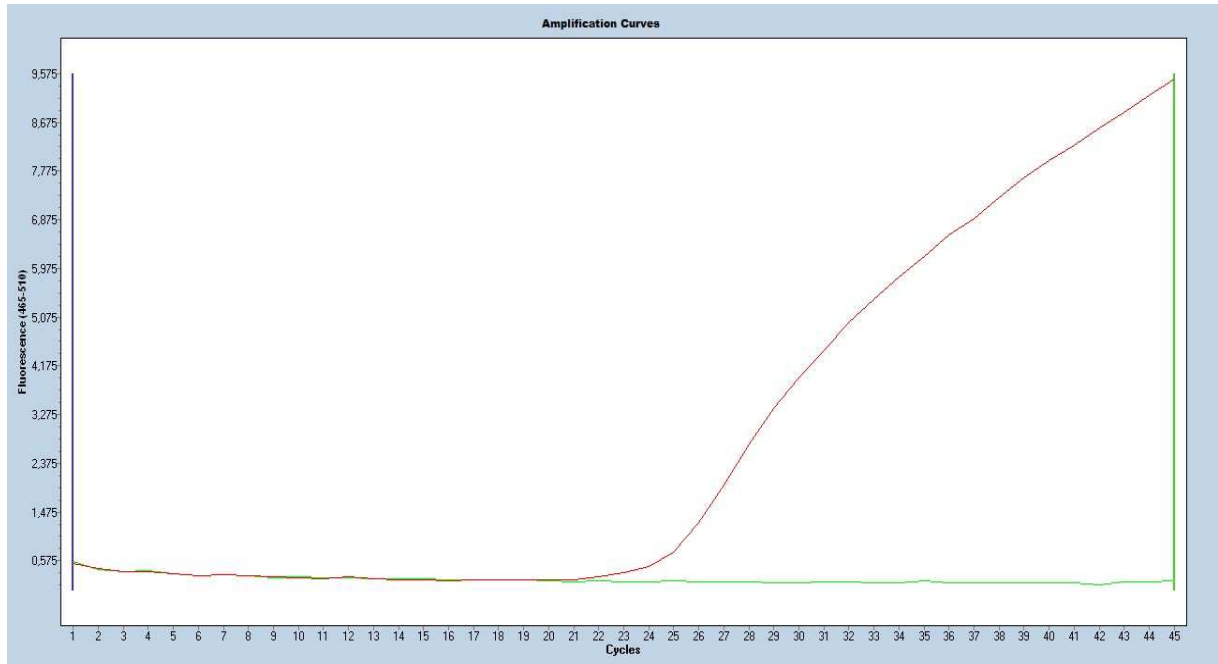


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (stx1/stx2) sur le LightCycler® 480II

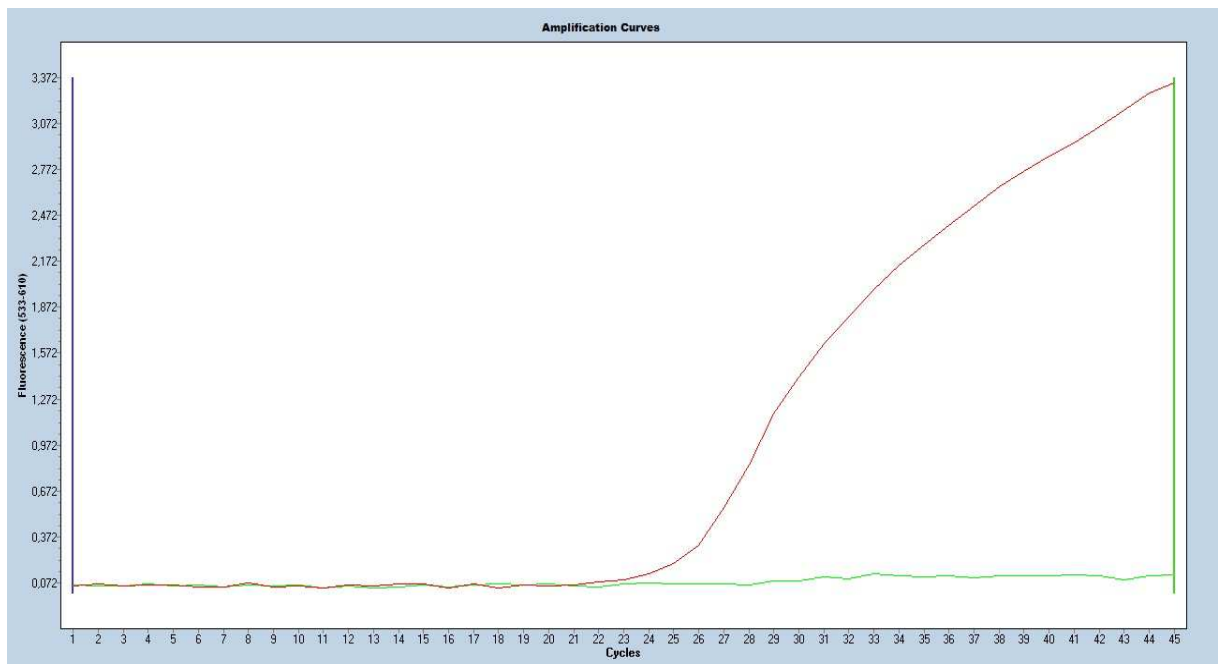


Figure 2 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (ipaH) sur le LightCycler® 480II

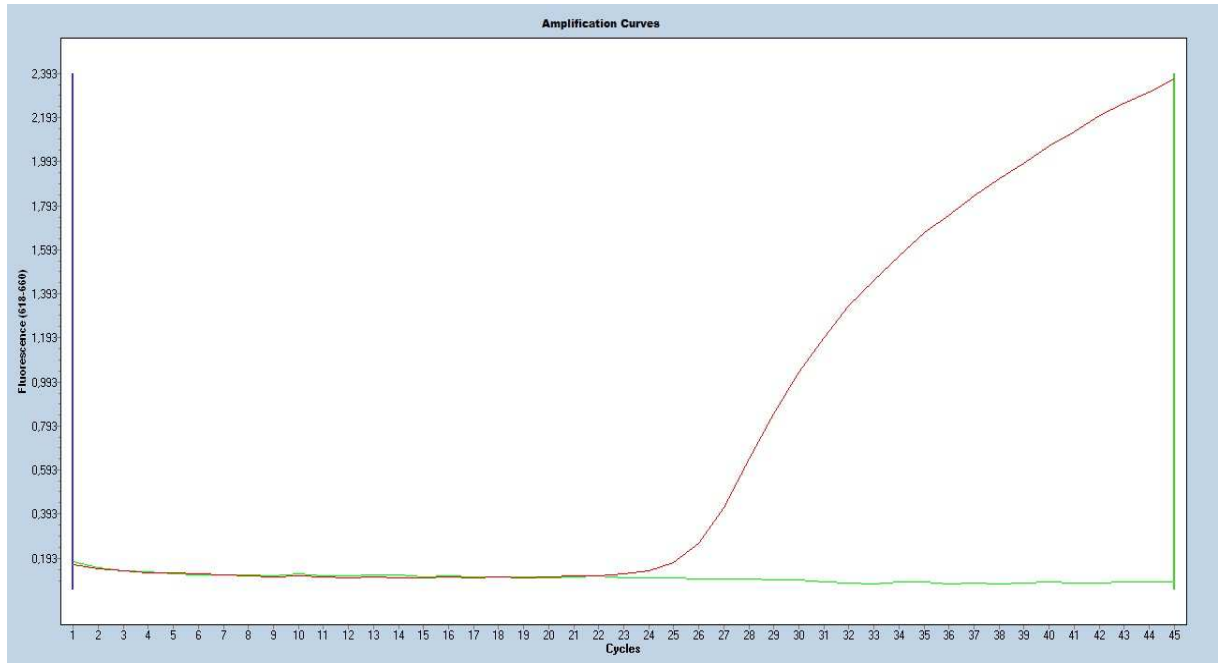


Fig. 3 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (eae) sur le LightCycler[®] 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes des facteurs de virulence				
stx1/stx2	ipaH	eae	ICD	Résultat
positif	négatif	négatif	positif/négatif	STEC (ECEH) détecté
négatif	positif	négatif	positif/négatif	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. détectés
négatif	négatif	positif	positif/négatif	ECEP détecté
positif	positif	négatif	positif/négatif	STEC (ECEH) et ECEI/ <i>Shigella</i> spp. détectés
positif	négatif	positif	positif/négatif	ECEH détecté
négatif	positif	positif	positif/négatif	ECEI/ <i>Shigella</i> spp. et ECEP détectés
positif	positif	positif	positif/négatif	ECEH et ECEI/ <i>Shigella</i> spp. détectés
négatif	négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

Selon la loi allemande relative à la protection contre les infections (IfSG), les ECEH sont des STEC (*E. coli* produisant des shigatoxines) qui sont pathogènes pour les humains. Puisqu'il n'existe aucune définition spécifique des STEC pathogènes pour les humains, chaque STEC doit être considéré comme un ECEH potentiel⁵.

Un échantillon est estimé négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais le Internal Control DNA est positif. Une inhibition de la réaction de PCR ou un échec de la procédure d'extraction peuvent être exclus par la détection du Internal Control DNA.

Un échantillon est estimé positif si à la fois l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est estimé positif s'il présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais le Internal Control DNA est négatif. 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 du contrôle d'amplification interne.

Un échantillon est estimé non valide si à la fois l'échantillon et le **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 validé pour les échantillons de selles et de cultures.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen 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[®] GENE EHEC/EPEC.
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 des gènes cibles (stx1/stx2, ipaH, eae).
8. La mucine peut présenter des caractéristiques d'interférence, même en petites quantités.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE EHEC/EPEC est ≥ 10 copies d'ADN par réaction pour stx1/stx2, ipaH et eae, respectivement.

Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent la série de dilutions de stx1/stx2, ipaH et eae ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl chacune) dans le LightCycler® 480II.

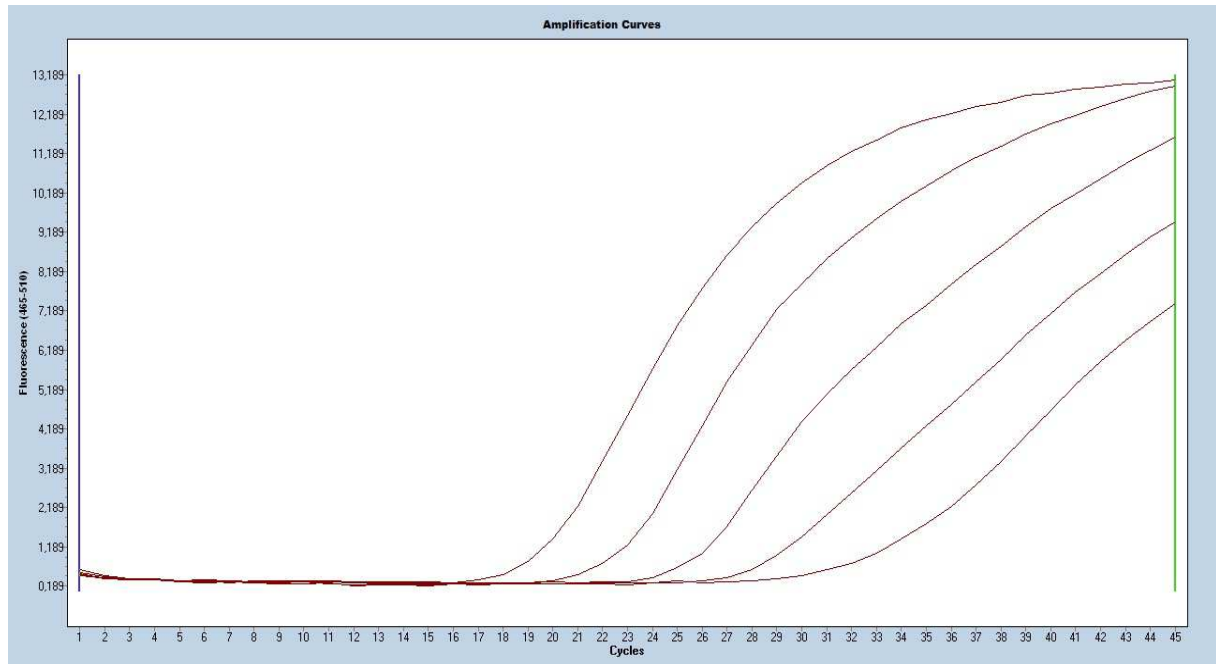


Figure 4 : Série de dilutions pour les gènes shigatoxines stx1/stx2 (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μl) avec le LightCycler® 480II

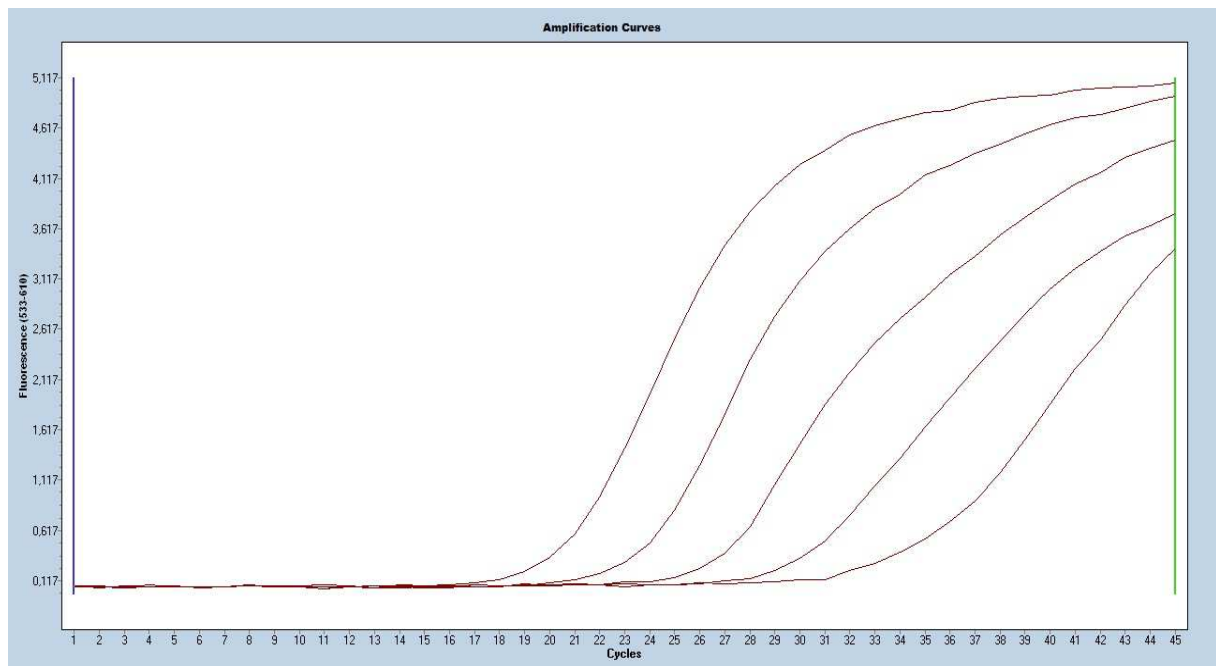


Fig. 5 : Série de dilutions pour le gène ipaH (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

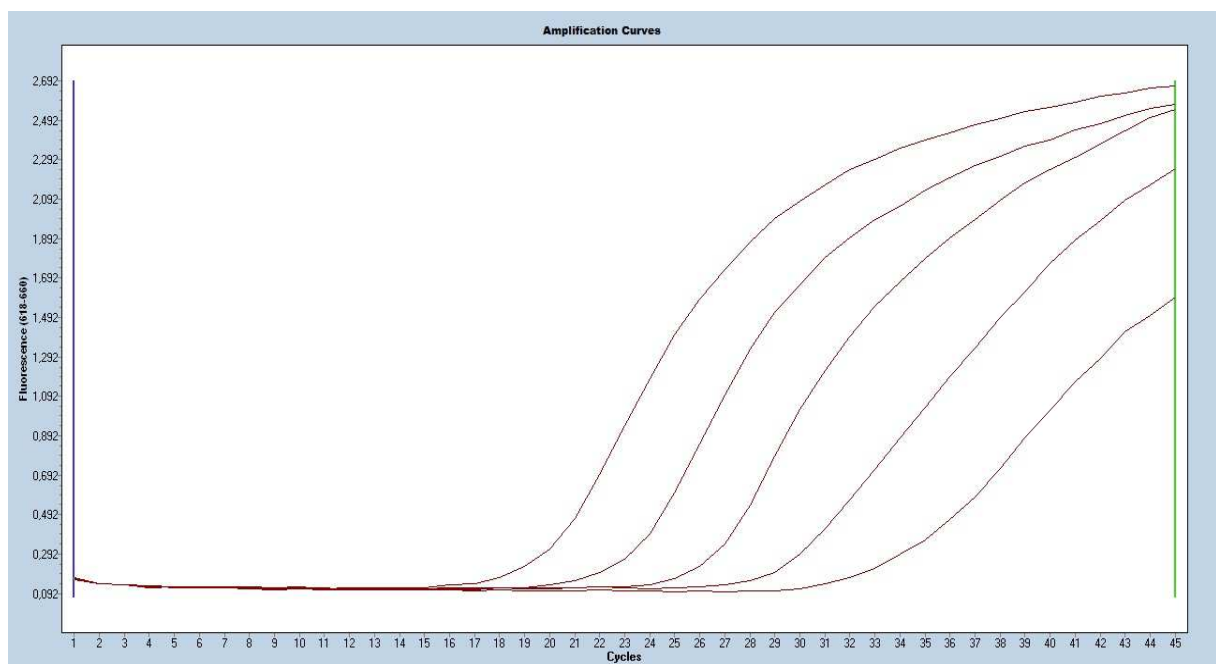


Fig. 6 : Série de dilutions pour le gène eae (10^5 à 10^1 copies d'ADN/ μ l) avec le LightCycler® 480II

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.

13.2 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE EHEC/EPEC est spécifique pour stx1/stx2, ipaH et eae. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12).

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée

Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	Norovirus GI	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Norovirus GII	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Rotavirus	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>E.coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> sous-esp. <i>lari</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-				

13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel RIDA[®]GENE EHEC/EPEC a été évaluée par rapport à de multiples sous-types de gènes stx1 et stx2 ainsi qu'à des sous-types des gènes ipaH et eae (voir tableau 13). Les sous-types de stx1 et stx2 suivants ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE EHEC/EPEC :

Tableau 13 : Test de la réactivité analytique










sous-types stx1					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
sous-types stx2					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
sous-types ipaH					
<i>Shigella boydii</i>	+	<i>Shigella flexneri</i>	+	<i>Shigella sonnei</i>	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+				
sous-types eae					
eae alpha	+	eae gamma	+		

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2014-08-14	Version de la publication
2018-08-24	Révision générale
2018-08-24	4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 11. Interprétation des résultats 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. Müller D, *et al.* Identification of Unconventional Intestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolates Expressing Intermediate Virulence Factor Profiles by Using a Novel Single-Step Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (10): 3380–3390.
2. Thiem VD, *et al.* Detection of Shigella by a PCR Assay Targeting the ipaH Gene Suggests Increased Prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(5): 2031-2035.
3. Kaper JM, *et al.* PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2:123-140.
4. Nataro JP and Kaper JM. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1998; 11(1): 132-201.
5. Robert Koch Institut. Erkrankungen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). RKI-Ratgeber für Ärzte 2008.