

## RIDA®GENE Bacterial Stool Panel

**REF** PG2405



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany  
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch .....	3
English.....	25
Español.....	47
Français.....	69
Italiano .....	93

## RIDA®GENE Bacterial Stool Panel

REF PG2405

### 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp., und *Yersinia enterocolitica* aus humanen Stuhlproben.

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch Bakterien verursachten gastrointestinalen Infektion unterstützen.

### 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Durchfallerkrankungen sind ein wichtiges Gesundheitsproblem und verursachen weltweit ca. 2 Milliarden Fälle pro Jahr. Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Durchfallerkrankungen die zweithäufigste Ursache von Todesfällen bei Kindern unter 5 Jahren weltweit, insbesondere in den Entwicklungsländern. Jedes Jahr sterben etwa 1,9 Millionen Kinder unter 5 Jahren an Durchfall, mehr als an AIDS, Malaria und Masern zusammen.<sup>1,2</sup> Häufige Ursachen einer bakteriellen Durchfallerkrankung sind *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Y. enterocolitica*. *Campylobacter*-Spezies sind weltweit eine der häufigsten Ursachen einer bakteriellen Diarrhö und verantwortlich für 400 bis 500 Millionen Fälle jährlich. Die Erkrankung, die durch die Gattung *Campylobacter* verursacht wird, bezeichnet man als Campylobacteriose. Mehr als 80 % der *Campylobacter*-Infektionen werden durch *C. jejuni* verursacht. Das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) schätzt, dass jedes Jahr mehr als 2 Millionen Fälle von Campylobacteriose in den USA auftreten. 2008 berichtete das US-amerikanische Lebensmittelqualitätsprogramm „FoodNet“ eine Inzidenz von 13 diagnostizierten Fällen pro 100.000 Personen. *C. jejuni* wurde bei 5 - 16 % der Kinder mit Durchfall in Industrieländern und bei 8 – 45 % der Kinder mit Durchfall in Entwicklungsländern nachgewiesen.<sup>4</sup> Etwa 100 Personen mit *Campylobacter*-Infektionen versterben jedes Jahr in den USA.<sup>3,4</sup> *Campylobacter*-Infektionen erfolgen über kontaminierte Lebensmittel, insbesondere Geflügelfleisch, kontaminiertes Trinkwasser, durch Kontakt mit infizierten Tieren oder auf fäkal-oralem Weg bei Kindern. Die infektiöse Dosis ist mit 500 Bakterien relativ gering. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 Tagen kommt es bei Personen, die an Campylobacteriose erkranken, zu Fieber, Durchfall, Bauchkrämpfen, Erbrechen,

Bauchschmerzen und Übelkeit. Als seltene langfristige Komplikationen können Autoimmunerkrankungen auftreten, zum Beispiel das Guillain-Barré-Syndrom.<sup>4</sup> *Salmonella*-Spezies sind ebenfalls eine der Hauptursachen einer bakteriellen Gastroenteritis weltweit. Derzeit sind mehr als 2.500 *Salmonella*-Serotypen beschrieben, die eine Gattung mit den beiden Arten *S. enterica* und *S. bongori* bilden und humanpathogen sind. Salmonellen verursachen Salmonellose oder Typhus. Jedes Jahr treten weltweit schätzungsweise 93,8 Millionen Fälle von Salmonellose mit 155.000 Todesfällen auf.<sup>6</sup> Das CDC schätzt, dass jedes Jahr in den USA mehr als 1,2 Millionen Fälle von Salmonellose mit mehr als 23.000 Krankenhauseinweisungen und 450 Todesfällen auftreten, sowie mehr als 1.800 Fälle von Typhus.<sup>5</sup> Die meisten der Salmonellose-Infektionen werden durch *S. typhimurium* und *S. enteritidis* verursacht, während Typhus durch *S. typhi* und *S. paratyphi* A, B oder C verursacht wird. Die Übertragung von Salmonellen erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel, kontaminiertes Wasser oder durch Kontakt mit infizierten Tieren. Die infektiöse Dosis von Salmonellen variiert von 1 bis 1000 Bakterien. Eine Salmonellose tritt nach einer Inkubationszeit von 6 – 72 h mit klinischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Bauchkrämpfe, Durchfall, Fieber und Kopfschmerzen auf. Bei Personen, die an Typhus erkranken, kommt es innerhalb 1 bis 3 Wochen nach Kontakt mit dem Organismus zu Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, hohem Fieber (ab 39°C bis 41°C) und gastrointestinalen Symptomen, einschließlich Bauchschmerzen und Durchfall.<sup>3,7</sup>

*Yersinia enterocolitica* ist eine von drei *Yersinia* Arten (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) der Gattung *Yersinia*, die für den Menschen pathogen sind und die intestinale Yersiniose verursachen. Das US-amerikanische Lebensmittelqualitätsprogramm „FoodNet“ berichtet für die USA eine Inzidenz von einem diagnostizierten Fall pro 100.000 Personen jährlich. Das Europäische Centre for Disease Prevention and Control berichtete 8.874 Fälle von Yersiniose im Jahr 2007, von denen etwa 5000 Fälle aus Deutschland stammten. Eine Infektion mit *Yersinia enterocolitica* erfolgt durch kontaminierte Lebensmittel oder kontaminiertes Wasser. Die geschätzte Infektionsdosis liegt bei 10<sup>4</sup> bis 10<sup>6</sup> Bakterien. Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 11 Tagen kommt es bei Personen, die an einer Yersiniose erkranken zu Durchfall, Erbrechen und Bauchschmerzen. *Y. enterocolitica* kann auch eine reaktive Arthritis verursachen.<sup>3,8</sup>

Die klassische Methode für die Labordiagnose von bakteriellen gastrointestinalen Erregern ist der kulturelle Nachweis, der mehrere Tage erfordert.

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. und *Yersinia enterocolitica* in humanen Stuhlproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente für *Campylobacter* spp. (16S rDNA), *Salmonella* spp. (*ttr*) und *Yersinia enterocolitica* (*ystA/ystB*) amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen von *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Y. enterocolitica* 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®GENE Bacterial Stool Panel 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 ungeöffnet 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 Bacterial Stool Panel 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
Real-time PCR-Geräte	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
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 IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des LightCycler® 480 z.
- 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 (Nuklease-freies Wasser)

## 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-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches DNA-Extraktionskit (z.B. z.B. RIDA®Xtract (R-Biopharm)) oder DNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel 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 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.

## 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	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 Eluat zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen 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, Rotor-Gene Q und **RIDA®CYCLER**

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 und 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 und RIDA®CYCLER

<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, Rotor-Gene Q und CFX96™

<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	Bemerkung
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Green	-
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Red	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Green	<b>Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Red	

## 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, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ 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 *1	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

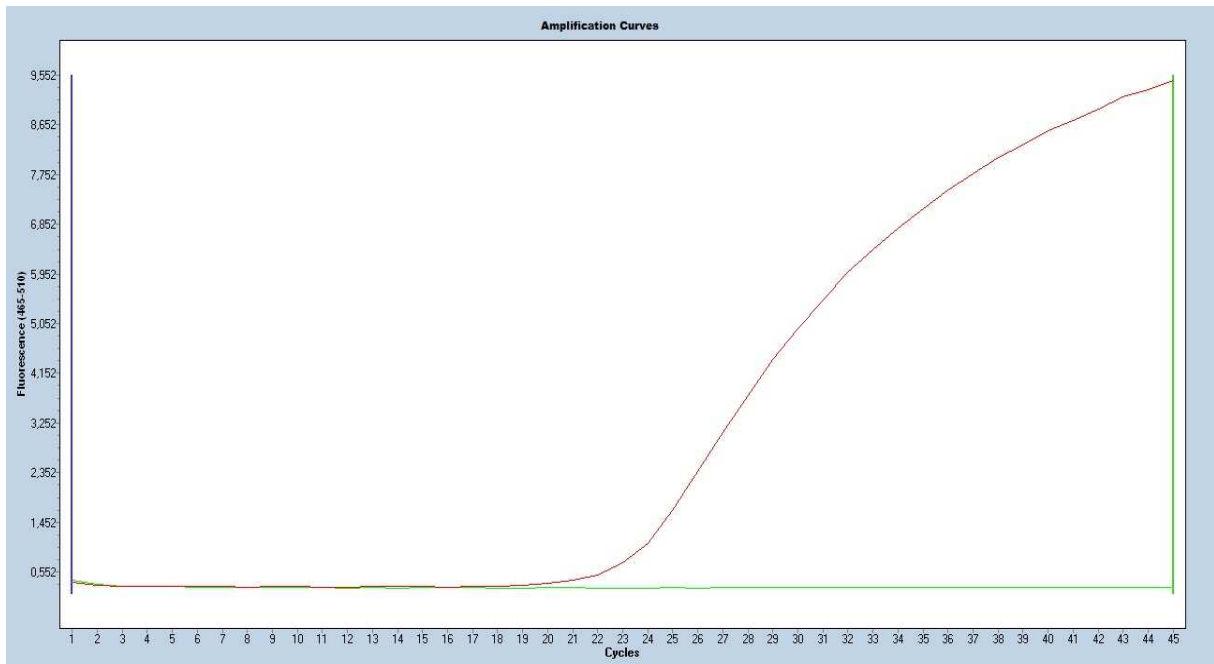
*\*1 Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

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.

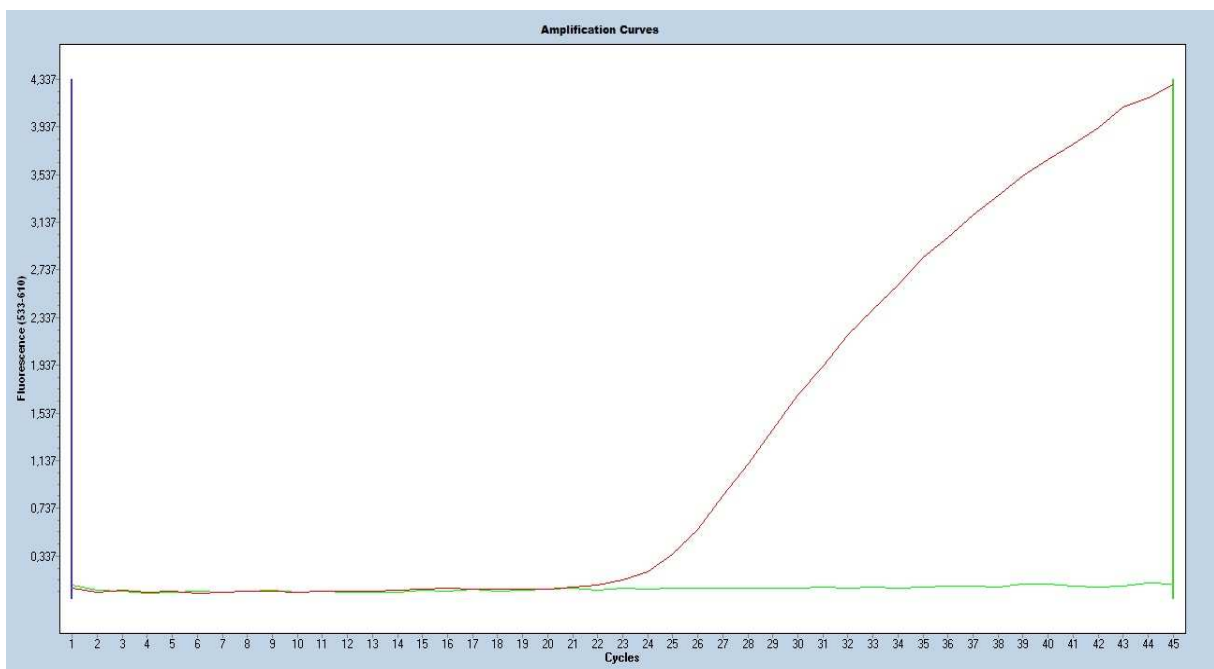
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

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

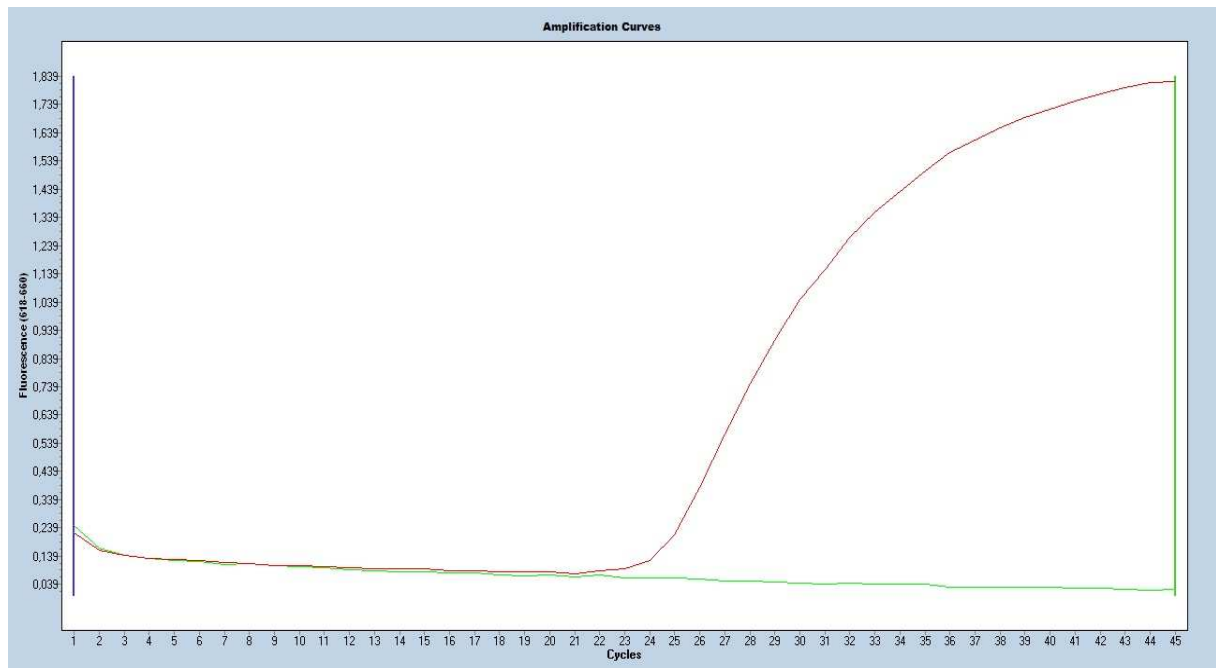
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Salmonella* spp.) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Yersinia enterocolitica*) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 3:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (*Campylobacter* spp.) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 11.

**Tab. 11:** Probenauswertung

Nachweis von			ICD	Ergebnis
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
positiv	negativ	negativ	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i> nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/ negativ	<i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp. und <i>Yersinia enterocolitica</i> nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp. und <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/ negativ	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>Campylobacter</i> spp. nachweisbar
negativ	negativ	negativ	Positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem und in der dazugehörigen **Internal Control DNA** zeigt.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem, jedoch keine für die **Internal Control DNA** zeigt. 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.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Probe keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige **Internal Control DNA** positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die **Internal Control DNA** im Nachweissystem keine Amplifikation 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 Stuhlproben validiert.
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®GENE Bacterial Stool Panel 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 die entsprechenden Zielgene (*Salmonella* spp. (ttr), *Yersinia enterocolitica* (ystA/ystB), *Campylobacter* spp. (16S rDNA nur *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)) vorhanden sind.
8. Mucin, Azithromycin und Stearin/Palmitinsäure können bereits in geringen Mengen interferierende Eigenschaften aufweisen.



## 13. Leistungsmerkmale

### 13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 282 extrahierte Stuhlproben mit dem RIDA®GENE Bacterial Stool Panel Test und einer in-house real-time PCR in einem Labor in den Niederlanden untersucht.

**Tab. 12:** Korrelation der *Salmonella* spp. Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positiv	50	0	50	Pos. Übereinstimmung: 100 %
	Negativ	0	232	232	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	50	232	282	

**Tab. 13:** Korrelation der *Yersinia enterocolitica* Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positiv	33	0	33	Pos. Übereinstimmung: 77 %
	Negativ	10	239	249	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	43	239	282	

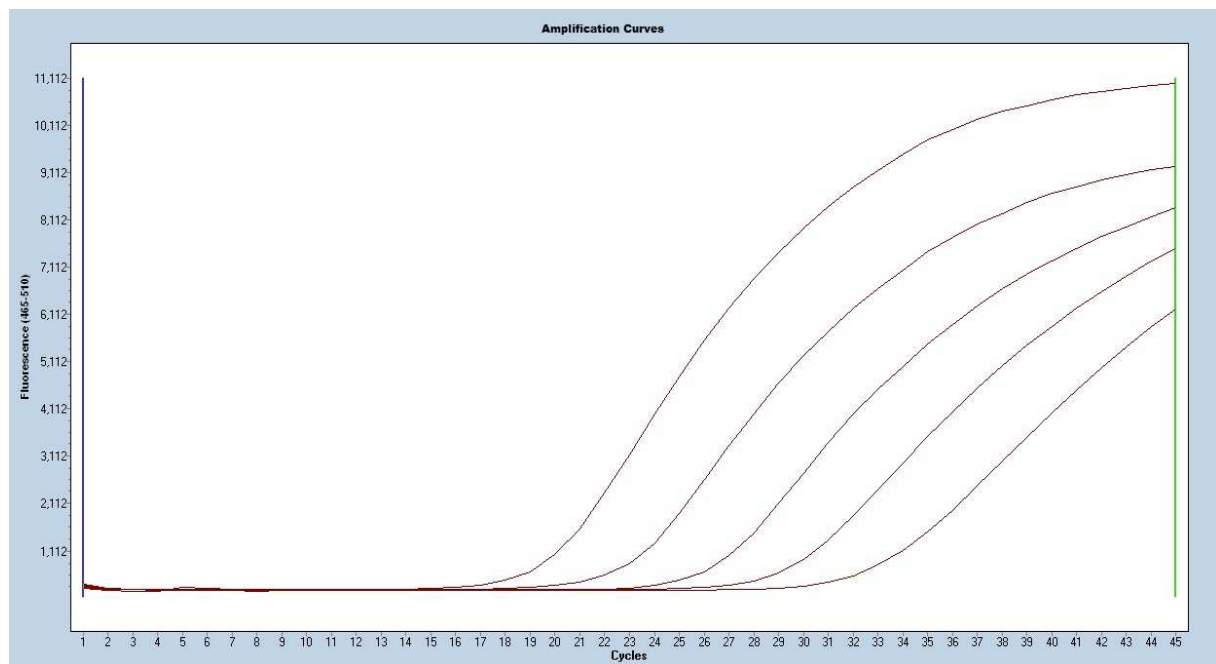
**Tab. 14:** Korrelation der *Campylobacter* spp. Ergebnisse mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Bemerkungen
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positiv	41	1	42	Pos. Übereinstimmung: 82 %
	Negativ	9	231	240	Neg. Übereinstimmung: 100 %
	Insgesamt	50	232	282	

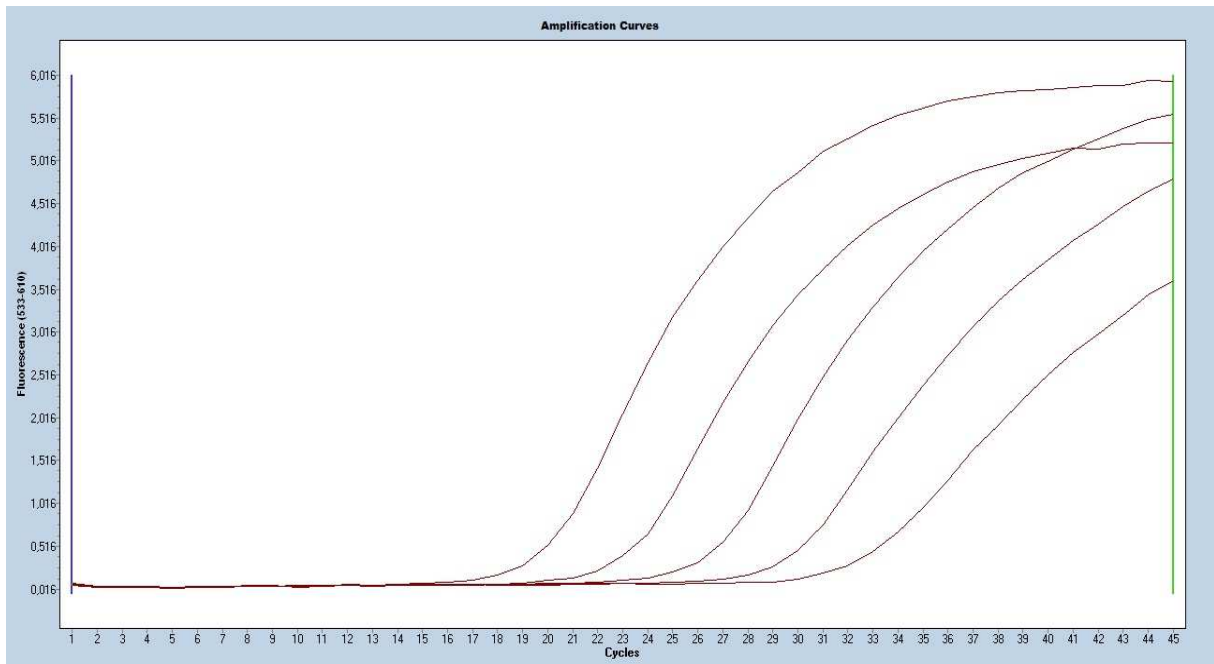
### 13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien/Reaktion für *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Yersinia enterocolitica*.

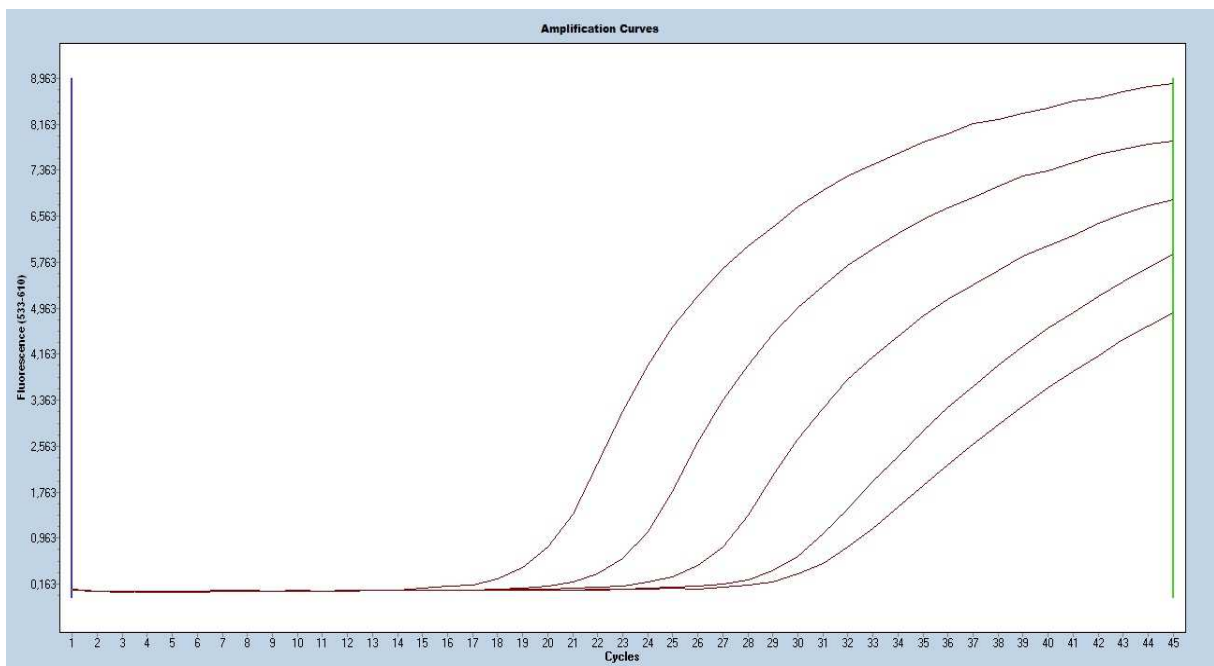
Die folgenden Abbildungen 4, 5, 6 und 7 zeigen Verdünnungsreihen von *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Yersinia enterocolitica* (jeweils  $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II.



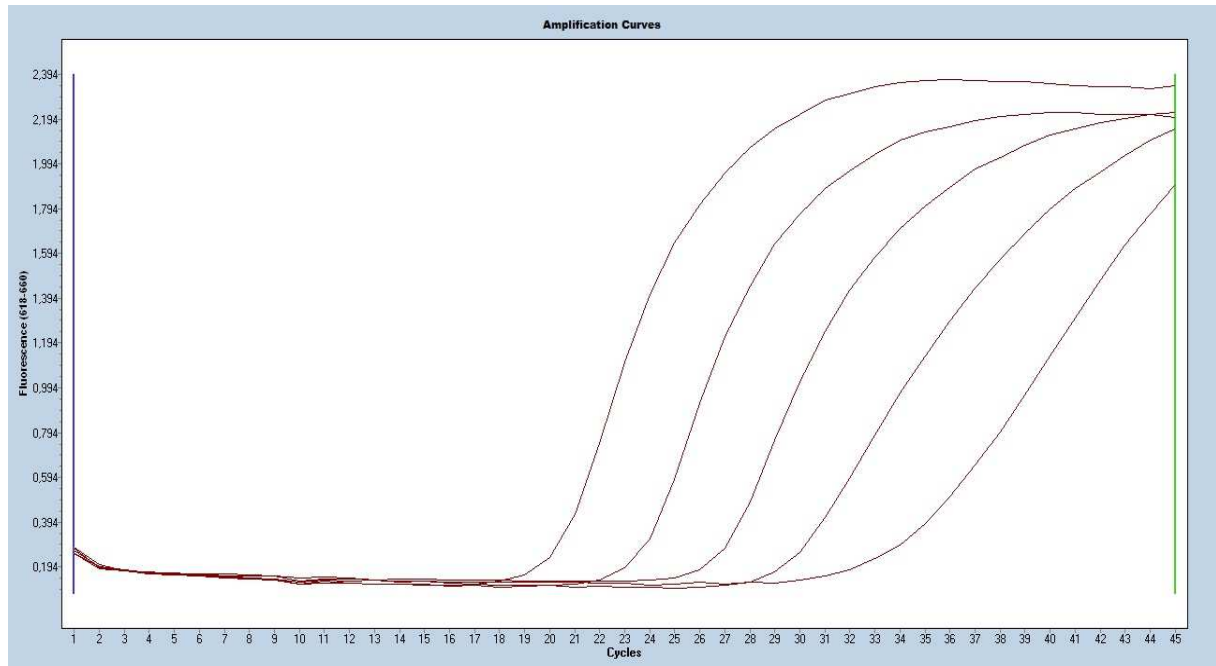
**Abb. 4:** Verdünnungsreihe *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 5:** Verdünnungsreihe *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler® 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) dem LightCycler® 480II



**Abb. 7:** Verdünnungsreihe *Campylobacter* spp. ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l)  
demLightCycler® 480II

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

### 13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR ist spezifisch für *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 15):

**Tab. 15:** Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 40	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia frederiksenii</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia kristensenii</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia rohdei</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Yersinia ruckeri</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, strain Wa	-		-

### 13.4 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR wurde mit verschiedenen *Salmonella*-Serotypen, *Campylobacter*-Spezies und *Yersinia enterocolitica* untersucht (s. Tab. 16). Alle *Salmonella*-Serotypen, *Campylobacter*-Spezies und *Yersinia enterocolitica* des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR nachgewiesen.

**Tab.16:** Analytische Reaktivitätstestung










<b>Salmonella-Serotypen</b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. Bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. Dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Yersinia-Spezies</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> subsp. <i>palaearctica</i>	+		
<b>Campylobacter - Subspezies</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-06-20	Vorversion
2020-01-06	Generelle Überarbeitung 1. Zweckbestimmung 3. Testprinzip 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9.3 Geräteeinstellungen 9.4 Detektionskanaleinstellung 10. Qualitätskontrolle 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale

## 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. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.



**English**

## **RIDA®GENE Bacterial Stool Panel**

**REF** PG2405

### **1. Intended use**

For *in vitro* diagnostic use. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel is a multiplex real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in human stool samples.

The RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR is intended for use as an aid in diagnosis of gastrointestinal infections caused by bacteria.

### **2. Summary and explanation of the test**

Diarrheal disease is a major health care problem and causes about 2 billion cases worldwide. The World Health Organization (WHO) ranks diarrheal disease as 2nd most common cause of child deaths among children under 5 years globally, particularly in developing countries. About 1.9 million children younger than 5 years of age perish from diarrhea each year, more than AIDS, malaria and measles combined.<sup>1,2</sup> Common causes of bacterial diarrheal disease are *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica*.

*Campylobacter* species are one of the most common causes of bacterial diarrhea worldwide, responsible for 400 million – 500 million cases annually. The disease caused by the genus *Campylobacter* is called campylobacteriosis. More than 80 % of *Campylobacter* infections are caused by *C. jejuni*. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimates more than 2 million cases of campylobacteriosis each year in the US. The Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) reported an incidence rate of 13 cases per 100,000 population in 2008. *C. jejuni* was detected in 5 - 16% of children with diarrhea in developed countries and in 8 - 45% of children with diarrhea in developing countries.<sup>4</sup> Approximately 100 persons with *Campylobacter* infections die each year in the US.<sup>3,4</sup> Infection with *Campylobacter* occurs through contaminated food, especially poultry, water, contact with infected animals or by fecal-oral route, particularly in children. The infectious dose is with 500 bacteria relatively low. After an incubation period of 2 to 5 days people with campylobacteriosis get fever, diarrhea, abdominal cramps, vomiting, abdominal pain and nausea. Potential long-term complications are autoimmune disorders, for example the Guillain-Barré syndrome (GBS).<sup>4</sup>

*Salmonella* species are also a leading cause of bacterial gastroenteritis worldwide. The genus *Salmonella* is divided into two species, *S. enterica* and *S. bongori*. So far, more than 2,500 *Salmonella* serotypes are described which are pathogenic for humans. *Salmonella* species are causing nontyphoidal salmonellosis or typhoid fever. It is estimated that 93.8 million cases of nontyphoidal salmonellosis infections with 155,000 deaths occurring globally each year.<sup>6</sup> The CDC estimates more than 1.2 million cases of nontyphoidal salmonellosis infections each year in the United States, with more than 23,000 hospitalizations and 450 deaths.<sup>5</sup> Most of the nontyphoidal salmonellosis infections are caused by the *S. typhimurium* and *S. enteritidis*, while typhoid fever is caused by *S. typhi* and *S. paratyphi* A, B or C. Transmission of *Salmonella* occurs through contaminated food, water or contact with infected animals. The infectious dose of *Salmonella* species is varying from 1 to 1000 bacteria. Nontyphoidal salmonellosis infection occurs after an incubation period of 6 – 72 h with clinical symptoms of nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea, fever and headache. People with typhoid fever get headache, achiness, high fever (from 39 °C to 41 °C), gastrointestinal symptoms, including abdominal pains and diarrhea within 1 to 3 weeks after exposure to the organism.<sup>3,7</sup>

*Yersinia enterocolitica* is one of three *Yersinia* species (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) of the genus *Yersinia* that are pathogenic for humans and cause of the gastrointestinal disease called Yersiniosis. According to FoodNet an incidence rate of 1 *Y. enterocolitica* infection per 100,000 persons occurs each year in the U.S. The European Centre for Disease Prevention and Control reported 8,874 cases in 2007, of which about 5000 cases were from Germany. Infection with Yersiniosis occurs after ingestion of contaminated food or water. The estimated infectious dose is between 10<sup>4</sup> to 10<sup>6</sup> bacteria. After an incubation period of 1 to 11 days people with yersiniosis get diarrhea, vomiting and abdominal pain. *Y. enterocolitica* has also been associated with reactive arthritis.<sup>3,8</sup> Culture is the classical method and for establishing the laboratory diagnosis of bacterial diarrhea, but requires several days.

### 3. Test principle

The RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel assay is a multiplex real-time PCR for the direct qualitative detection of *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp., and *Yersinia enterocolitica* in human stool samples. After DNA-isolation, amplification of the gene fragments specific for *Salmonella* spp. (*ttr*), *Campylobacter* spp. (16S rDNA) and *Y. enterocolitica* (*ystA/ystB*) occurs, if present. The amplified targets of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Y. enterocolitica* are 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 Bacterial Stool Panel 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	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Taq-Polymerase	1x	80 µl	red
D	Internal Control DNA	2x	1700 µl	orange
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	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 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 the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

## 6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA®GENE Bacterial Stool Panel 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®Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR instruments	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
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®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler® 480II or LightCycler® 480 z
- 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 water)

## 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

### 8.1 Sample 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.

It is recommended to dilute the stool samples before extraction 1:3 with water. Vortex the diluted stool sample intensely and centrifuge at 1000 x g for 30 sec. From the supernatant use the appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel real-time PCR 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 **not** directly to the specimen.

## 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 calculating an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and briefly centrifuge 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 negative control PCR-Mix.

**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 positive control PCR-Mix.

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:** Real-time PCR profile for LightCycler® series, Rotor-Gene Q and **RIDA®CYCLER**

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:** Real-time PCR profile for Mx3005P, ABI 7500 und 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®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR assays in one run.

**Tab. 7:** Universal real-time PCR profile for LightCycler® series and RIDA®CYCLER

<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, ABI 7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<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
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Green	-
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Red	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Check that reference dye is none</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Check that passive reference option ROX is none</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Green	<b>The gain settings have to be set to 5, according to the default settings</b>
	ICD	Yellow	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Red	

## 10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacture' s instruction. Positive and negative controls have to show correct results (see Table 10, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3) in order to determine a valid run.

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

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

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive Control	Positive	NA *1	See Quality Assurance Certificate
Negative Control	Negative	Ct > 20	Not detectable

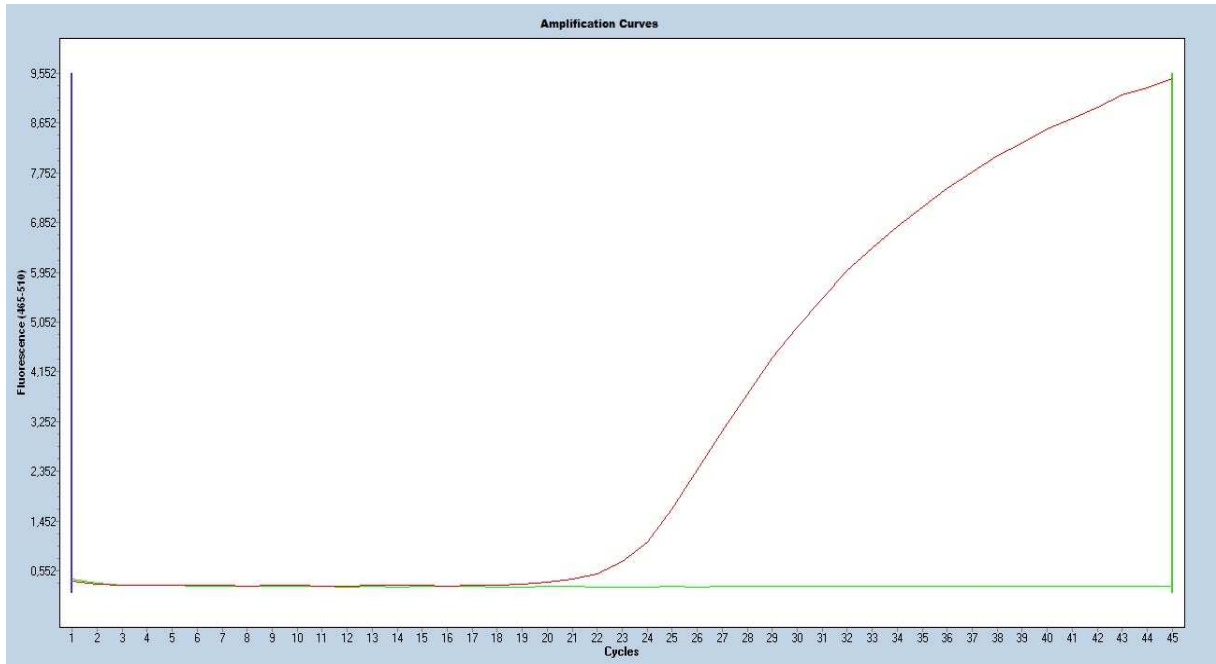
*\*1 No Ct value is required for the ICD to make a positive call for the positive control.*

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.

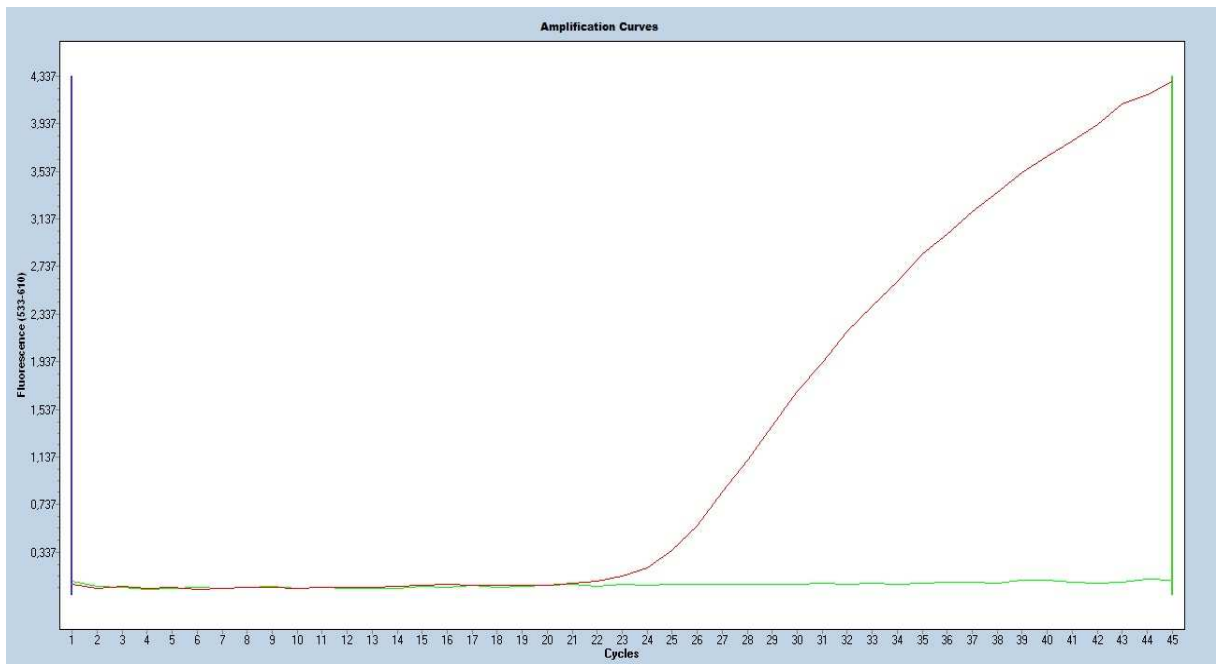
If the negative control is not negative but the positive control is valid, prepare all new reactions including the controls.

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

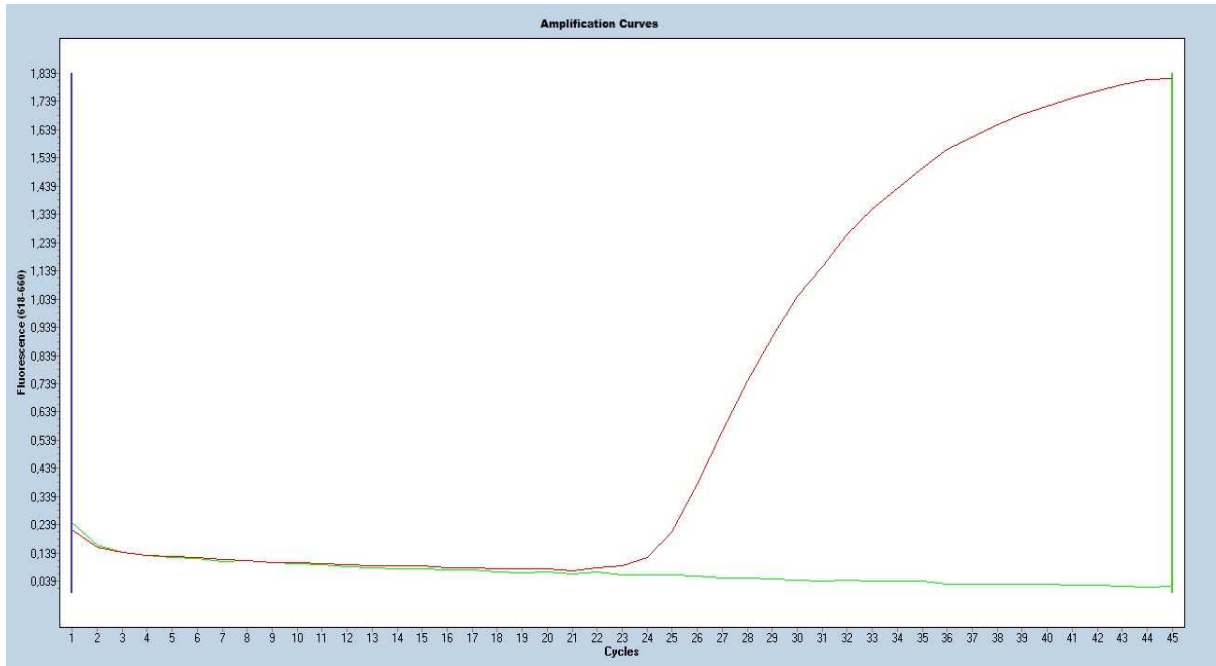
- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure



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



**Fig. 2:** Correct run of the positive and negative control (*Yersinia enterocolitica*) on the LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Correct run of the positive and negative control (*Campylobacter* spp.) on the LightCycler® 480II

## 11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 11.

**Tab.11:** Sample interpretation

Target genes				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Result
<b>positive</b>	negative	negative	<b>positive/negative</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. detected</b>
negative	<b>positive</b>	negative	<b>positive/negative</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> detected</b>
negative	negative	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp. detected</b>
<b>positive</b>	<b>positive</b>	negative	<b>positive/negative</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. and <i>Yersinia enterocolitica</i> detected</b>
<b>positive</b>	negative	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. and <i>Campylobacter</i> spp. detected</b>
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Campylobacter</i> spp. detected</b>
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b><i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Campylobacter</i> spp. detected</b>
negative	negative	negative	<b>positive</b>	<b>Target genes not detected</b>
negative	negative	negative	<b>negative</b>	<b>Invalid</b>

A sample is evaluated positive, if both, the sample and the Internal Control DNA show an amplification signal in the detection system.

A sample is also evaluated positive, if the sample shows an amplification signal in the detection system, but the Internal Control DNA is negative. The detection of the Internal Control DNA is not necessary, because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control DNA.

A sample is evaluated negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system, but the **Internal Control DNA** is positive. An inhibition of the PCR reaction or a failure in the extraction procedure can be excluded by the detection of the **Internal Control DNA**.

A sample is evaluated invalid, if both, the sample and the **Internal Control DNA** show no amplification signal in the detection system. The sample contained 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 validated for stool 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®GENE Bacterial Stool Panel 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 respective target genes (*Salmonella* spp. (ttr), *Y. enterocolitica* (ystA/ystB), *Campylobacter* spp. (16S rDNA only *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)).
8. **Mucin, azithromycin and stearic/palmitic acid may show interfering characteristics even in small quantities.**

## 13. Performance characteristics

### 13.1 Clinical performance

In a retrospective clinical validation study 282 extracted stool samples were analyzed with the RIDA®GENE Bacterial Stool Panel assay and an in-house real-time PCR assay in a laboratory in the Netherlands.

**Tab. 12:** Correlation of the *Salmonella* spp. results with the RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR and reference in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Comments
		Positive	Negative	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positive	50	0	50	Pos. agreement: 100 %
	Negative	0	232	232	Neg. agreement: 100 %
	Total	50	232	282	

**Tab. 13:** Correlation of the *Yersinia enterocolitica* results with the RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR and reference in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Comments
		Positive	Negative	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positive	33	0	33	Pos. agreement: 77 %
	Negative	10	239	249	Neg. agreement: 100 %
	Total	43	239	282	

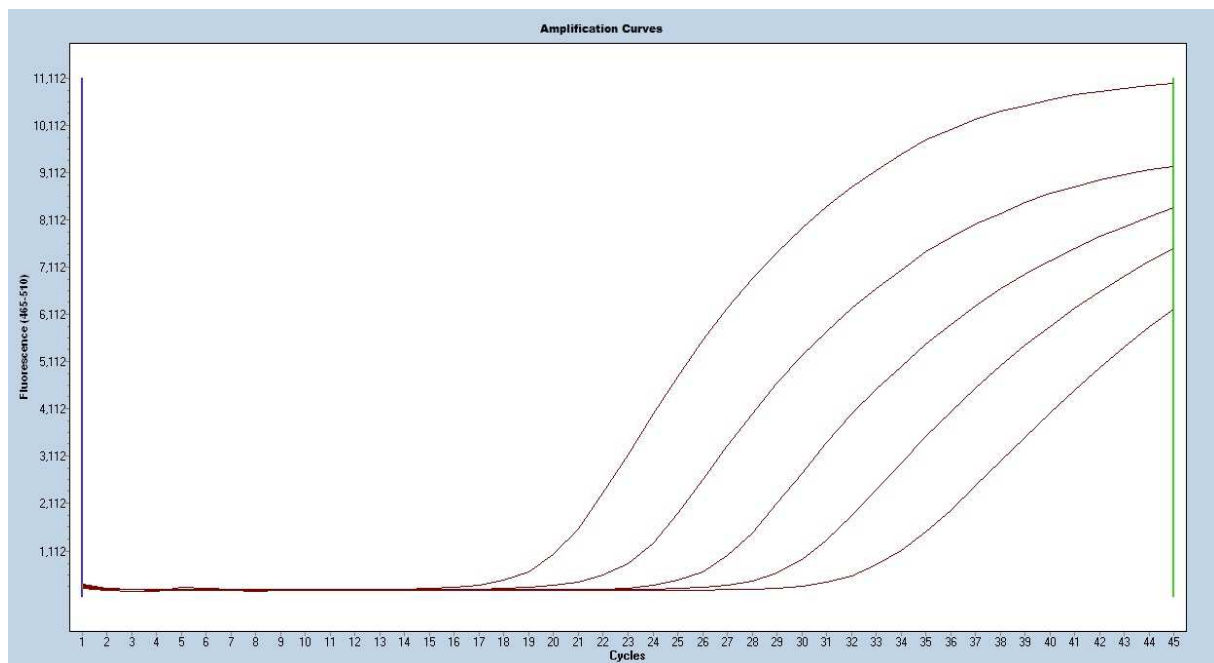
**Tab. 14:** Correlation of the *Campylobacter* spp. results with the RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR and reference in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			Comments
		Positive	Negative	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positive	41	1	42	Pos. agreement: 82 %
	Negative	9	231	240	Neg. agreement: 100 %
	Total	50	232	282	

### 13.2 Analytical sensitivity

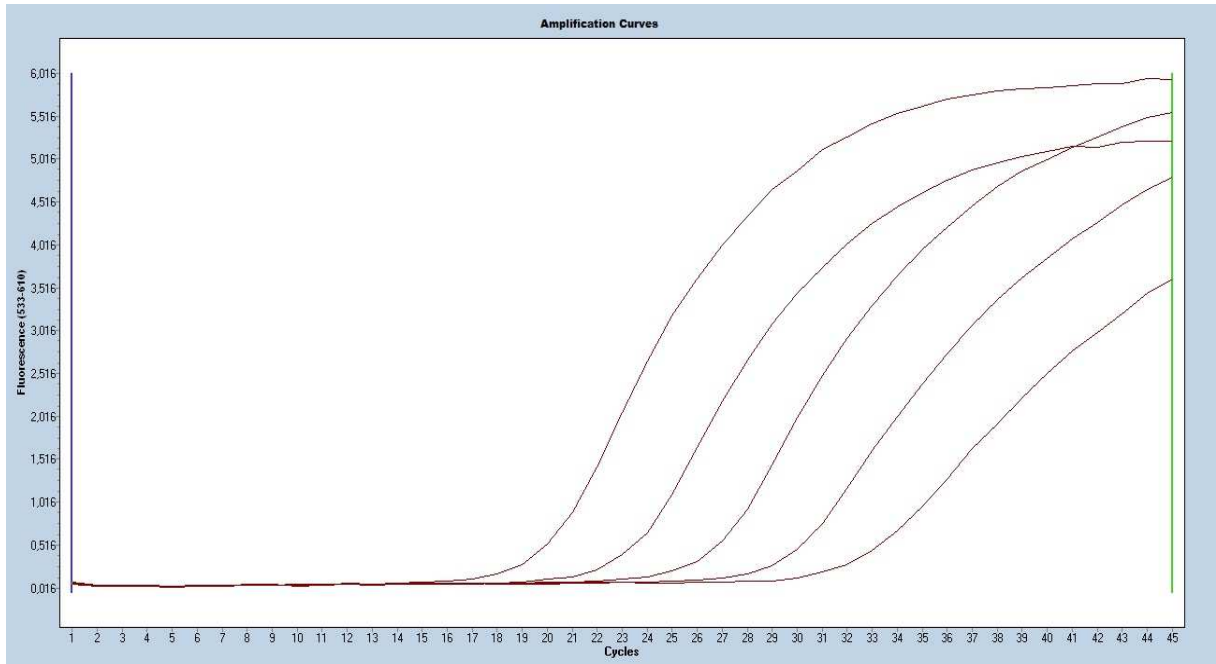
The RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction for *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica*.

The following figures 4, 5, 6 and 7 show dilution series of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* (each  $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler® 480II.

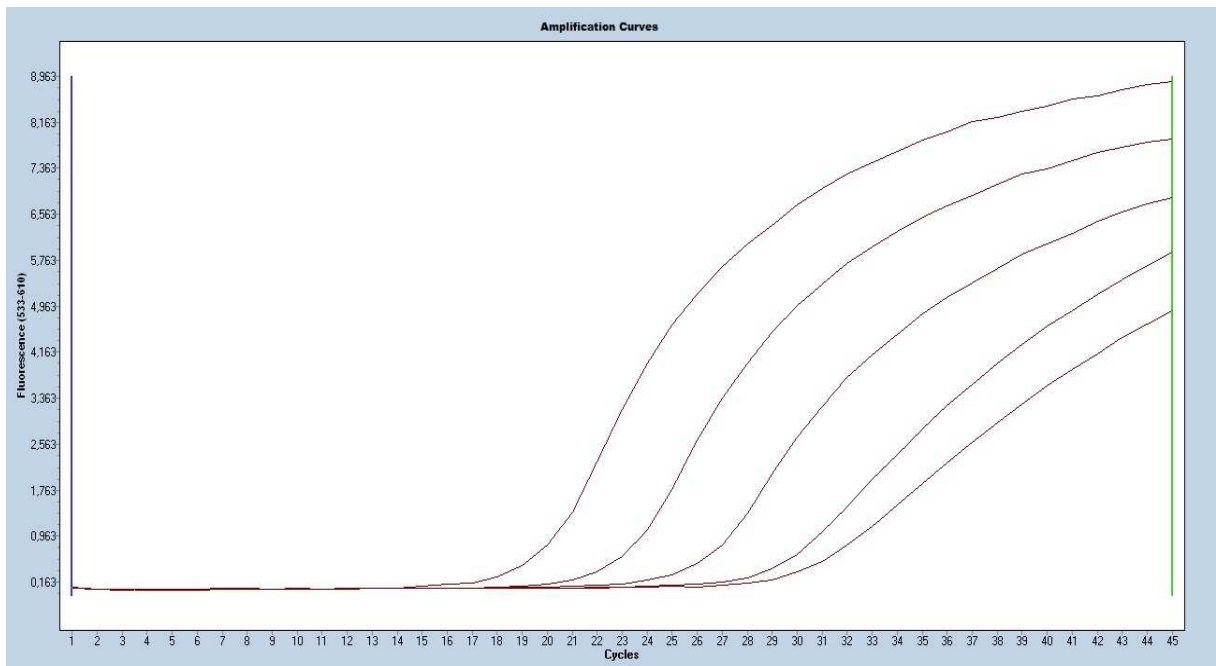


**Fig. 4:** Dilution series *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler® 480II

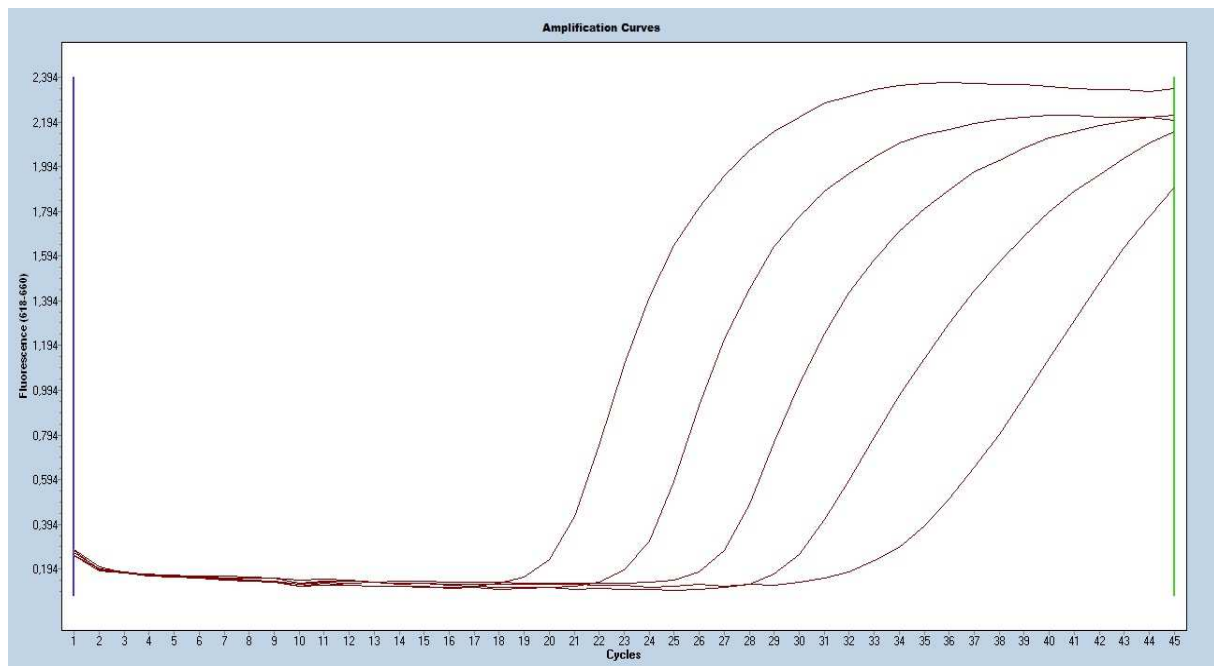




**Fig. 5:** Dilution series *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler® 480II



**Fig.6:** Dilution series *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler® 480II



**Fig.7:** Dilution series *Campylobacter* spp. ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler® 480II

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

### 13.3 Analytical specificity

The RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR is specific for *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 15):

**Tab. 15:** Cross-reactivity testing

Adenovirus 40	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, human, strain Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia frederiksenii</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia kristensenii</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia rohdei</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Yersinia ruckeri</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, strain Wa	-		-

### 13.3 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR was evaluated against multiple *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* species and *Yersinia enterocolitica* (see Tab. 16). All *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* species and *Yersinia enterocolitica* of the panel were detected by the RIDA®GENE Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR.

**Tab. 16:** Analytical reactivity testing










<b><i>Salmonella</i> serotypes</b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<b><i>S. paratyphi B</i></b>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<b><i>S. paratyphi C</i></b>	+
<i>S. Bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<b><i>S. typhi</i></b>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. Dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b><i>Yersinia</i> species</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> subsp. <i>palaearctica</i>	+		
<b><i>Campylobacter</i> subspecies</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

## 14. Version history

Version number	Chapter and designation
2018-06-20	Previous version
2020-01-06	General revision 1. Intended use 3. Test principle 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 9.3 PCR instrument set-up 9.4 Detection channel set-up 10. Quality control 12. Limitations of the method 13. Performance characteristics

## 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. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.

## **RIDA®GENE Bacterial Stool Panel**

**REF** PG2405

### **1. Uso previsto**

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es un ensayo de PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* en muestras de heces humanas.

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel está previsto como una ayuda para el diagnóstico de infecciones gastrointestinales causadas por bacterias.

### **2. Resumen y descripción del ensayo**

Las enfermedades diarreicas son un gran problema de salud que causa alrededor de 2000 millones de casos en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las enfermedades diarreicas como la segunda causa más común de muertes infantiles entre niños menores de 5 años a nivel mundial, en particular en los países en desarrollo. Cada año, mueren de diarrea aproximadamente 1,9 millones de niños menores de 5 años, más que por el SIDA, la malaria y el sarampión juntos.<sup>1,2</sup> Entre las causantes comunes de las enfermedades diarreicas bacterianas están *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Y. enterocolitica*.

Las especies de *Campylobacter* son una de las causas más comunes de diarrea bacteriana en todo el mundo, y son responsables de 400 a 500 millones de casos anualmente. La enfermedad causada por el género *Campylobacter* se denomina campilobacteriosis. Más del 80 % de las infecciones por *Campylobacter* son causadas por *C. jejuni*. En los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos se calcula que, en ese país, hay más de 2 millones de casos de campilobacteriosis al año.

La Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) (Red de vigilancia activa de enfermedades transmitidas por los alimentos) informó una tasa de incidencia de 13 casos por cada 100 000 habitantes en 2008.

Se detectó *C. jejuni* en entre el 5 % y el 16 % de los niños con diarrea en países desarrollados, y en entre el 8 % y el 45 % de los niños con diarrea en los países en desarrollo.<sup>4</sup> Cada año mueren en Estados Unidos aproximadamente 100 personas con infecciones por *Campylobacter*.<sup>3,4</sup> La infección por *Campylobacter* se produce a través de alimentos contaminados, en especial la carne de aves, el agua, el contacto

con animales infectados o por vía fecal-oral, particularmente en niños. La dosis infecciosa, de 500 bacterias, es relativamente baja. Tras un periodo de incubación de entre 2 a 5 días, las personas con campilobacteriosis desarrollan fiebre, diarrea, calambres abdominales, vómito, dolor abdominal y náuseas. Las posibles complicaciones a largo plazo son los trastornos autoinmunitarios, como el síndrome de Guillain-Barré (SGB).<sup>4</sup>

Las especies de *Salmonella* son también una de las causas principales de gastroenteritis bacteriana a nivel mundial. El género *Salmonella* se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. Hasta ahora, se han descrito más de 2500 serotipos de *Salmonella* que son patogénicos para los humanos. Las especies de *Salmonella* provocan salmonelosis no tifoidea o fiebre tifoidea. Se estima que cada año se producen mundialmente 93,8 millones de casos de salmonelosis no tifoidea, con 155 000 muertes.<sup>6</sup> En los CDC se calcula que hay más de 1,2 millones de casos anuales de salmonelosis no tifoidea en Estados Unidos, con más de 23 000 hospitalizaciones y 450 muertes.<sup>5</sup> La mayoría de los casos de salmonelosis no tifoidea son causados por *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, mientras que la fiebre tifoidea es causada por *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B o C. La transmisión de *Salmonella* ocurre a través de alimentos o agua contaminados o mediante el contacto con animales infectados. La dosis infecciosa de las especies de *Salmonella* varía de entre 1 a 1000 bacterias. La salmonelosis no tifoidea se produce tras un periodo de incubación de entre 6 a 72 horas con síntomas clínicos de náuseas, vómito, calambres abdominales, diarrea, fiebre y cefalea. Las personas con fiebre tifoidea desarrollan cefalea, dolores, fiebre alta (de 39 °C a 41 °C), síntomas gastrointestinales, como dolores abdominales y diarrea, en un plazo de entre 1 a 3 semanas después de la exposición al microorganismo.<sup>3, 7</sup>

*Yersinia enterocolitica* es una de las tres especies de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) del género *Yersinia* que son patogénicas para los seres humanos y provocan la enfermedad gastrointestinal llamada yersiniosis.

De acuerdo con FoodNet, cada año, hay una tasa de incidencia de 1 infección por *Y. enterocolitica* por cada 100 000 personas en los Estados Unidos. El Centro de Prevención y Control de Enfermedades europeo reportó 8874 casos en 2007, de los cuales, alrededor de 5000 se presentaron en Alemania. La yersiniosis ocurre luego de la ingestión de alimentos o agua contaminados. La dosis infecciosa estimada es de entre 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> bacterias. Tras un periodo de incubación de entre 1 a 11 días, las personas con yersiniosis desarrollan diarrea, vómito y dolor abdominal.

*Y. enterocolitica* también ha sido asociada con artritis reactiva.<sup>3,8</sup>

El cultivo es el método clásico para el establecimiento del diagnóstico en laboratorio de diarrea bacteriana, pero necesita de varios días.

### 3. Principio del ensayo

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es un ensayo PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* en muestras de heces humanas. Después de



aislar el ADN, tiene lugar la amplificación de los fragmentos génicos específicos de *Salmonella* spp. (ttr), *Campylobacter* spp. (ADNr 16S) y *Y. enterocolitica* (ystA/ystB), si se encuentran presentes. Las dianas amplificadas de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Y. enterocolitica* se detectan 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®GENE Bacterial Stool Panel 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	1700 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 de 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 los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 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 manera adecuada (a entre 2 °C y 8 °C).

## 6. Reactivos necesarios no suministrados

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

**Tabla 2:** Equipo necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA®Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
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 IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II o el LightCycler® 480 z
- 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

### 8.1 Preparación de las muestras 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 (p. ej. RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ADN (p. ej., Maxwell® 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. 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 de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel contiene un **Internal Control DNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza 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 de **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.

## 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 utilizarlos. 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	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).  
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 la PCR del control positivo.

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

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

## 9.3 Configuración del equipo de PCR

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

**Tabla 5:** Perfil de PCR en tiempo real en los equipos LightCycler®, Rotor-Gene Q y RIDA®CYCLER

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 PCR en tiempo real para Mx3005P, ABI 7500 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 la misma etapa.

### 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 RIDA®GENE y ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

**Tabla 7:** Perfil universal por PCR en tiempo real en los equipos LightCycler® y RIDA®CYCLER

<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, ABI 7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<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
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	-
	ICD	Amarillo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Naranja	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rojo	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	<b>La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.</b>
	ICD	Amarillo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Naranja	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rojo	

## 10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivos y negativos deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 10, figuras 1, 2 y 3) para determinar una corrida válida.

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

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

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Positive Control	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad
Control negativo	Negativo	Ct > 20	No es detectable

\*1 No se requiere un valor de Ct del ICD para determinar que el control positivo es positivo.

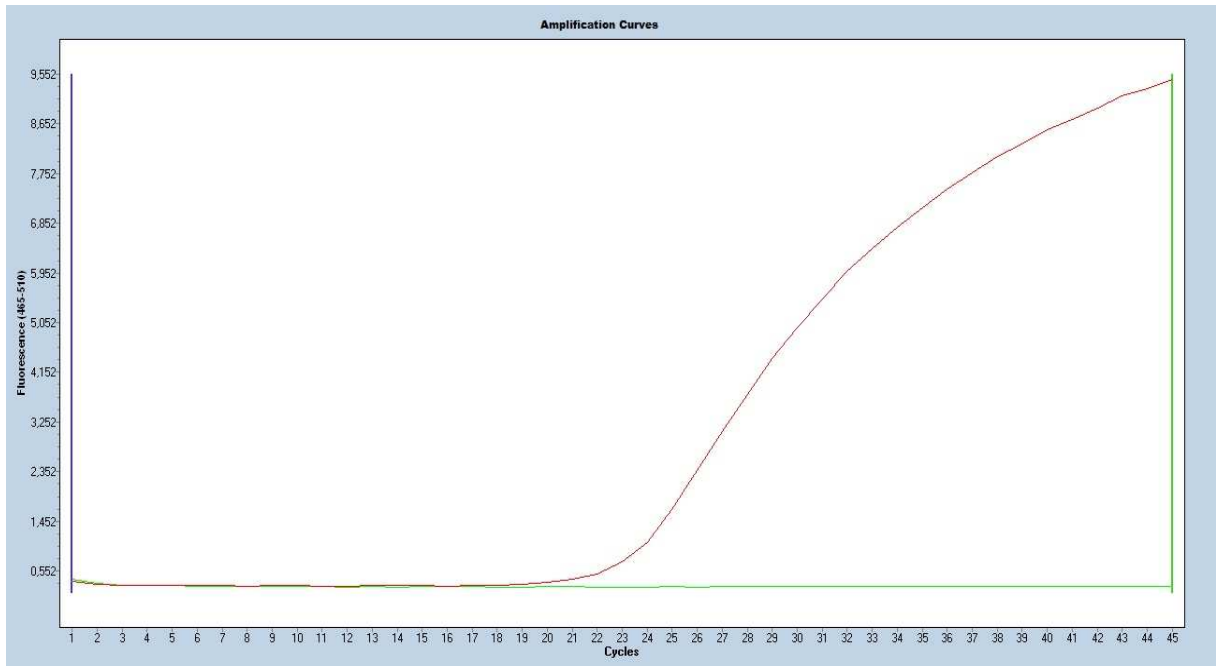
Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

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

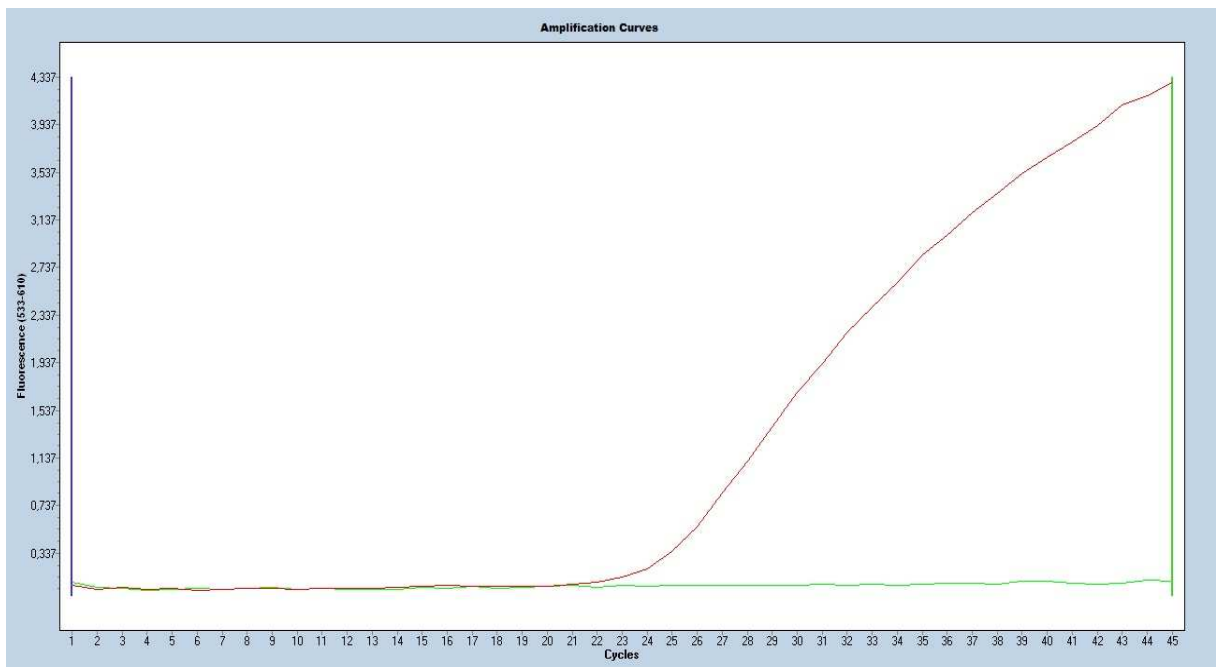
Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

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

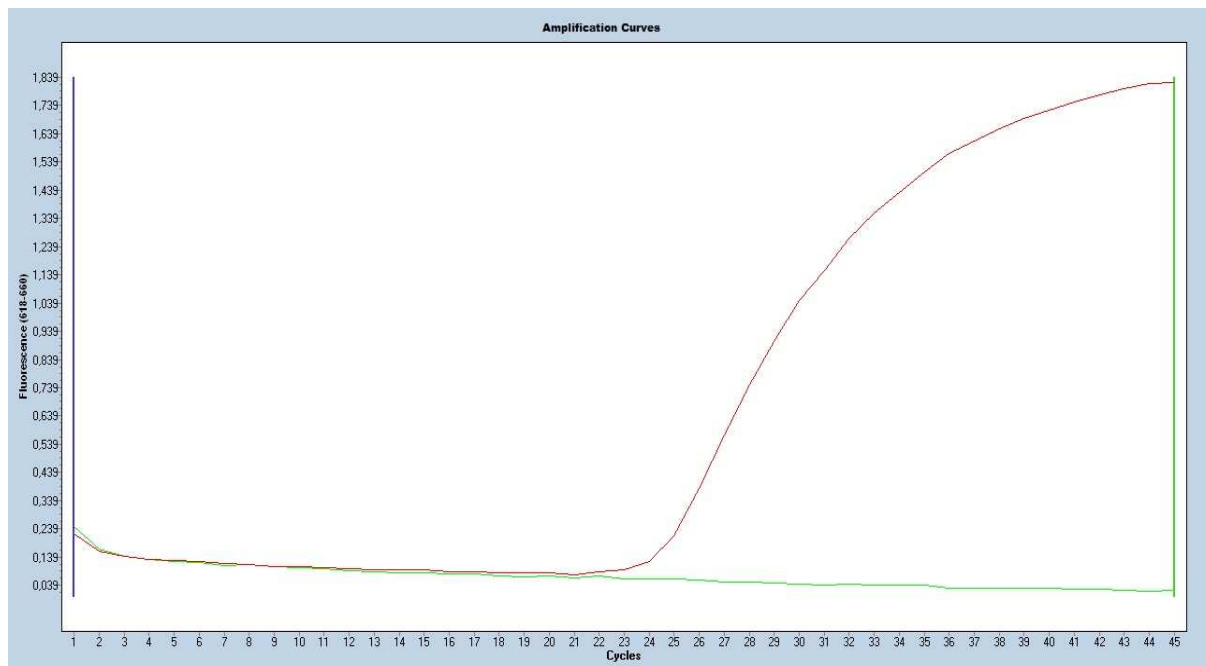




**Figura 1:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Salmonella* spp.) en el LightCycler® 480II



**Figura 2:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Yersinia enterocolitica*) en el LightCycler® 480II



**Figura 3:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (*Campylobacter* spp.) 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				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Resultado
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. detectada
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Yersinia enterocolitica</i> detectada
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Campylobacter</i> spp. detectada
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Yersinia enterocolitica</i> detectadas
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Campylobacter</i> spp. detectadas
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> spp. detectadas
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Campylobacter</i> spp. detectadas
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si tanto la muestra como el **Internal Control DNA** presentan una señal de amplificación en el sistema de detección.

Se determina que una muestra es positiva si presenta señal de amplificación en el sistema de detección, pero el **Internal Control DNA** es negativo. La detección del **Internal Control DNA** 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.

Se determina que una muestra es negativa si no presenta señal de amplificación en el sistema de detección, pero el **Internal Control DNA** es positivo. La inhibición de la reacción de PCR o un fallo en el procedimiento de extracción se pueden excluir por la detección del **Internal Control DNA**.

Se determina que una muestra no es válida si ni la muestra ni el **Internal Control DNA** presentan una señal de amplificación en el sistema de detección. La muestra contenía 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 está validado para muestras de heces.
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® GENE Bacterial Stool Panel.
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. Sin embargo, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana correspondientes (*Salmonella* spp. [ttr], *Y. enterocolitica* [ystA/ystB], *Campylobacter* spp. [ADNr 16S solo de *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*]).
8. La mucina, la azitromicina y el ácido esteárico/palmítico pueden mostrar características de interferencia incluso en pequeñas cantidades.

## 13. Características de rendimiento

### 13.1 Rendimiento clínico

En un estudio de validación clínica retrospectivo se analizaron 282 muestras de heces extraídas con el ensayo RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y con un ensayo de PCR en tiempo real interno, en un laboratorio en los Países Bajos.

**Tabla 12:** Correlación de los resultados de *Salmonella* spp entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	50	0	50	Concordancia pos.:100 %
	Negativo	0	232	232	Concordancia neg.:100 %
	Total	50	232	282	

**Tabla 13:** Correlación de los resultados de *Yersinia enterocolitica* entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	33	0	33	Concordancia pos.: 77 %
	Negativo	10	239	249	Concordancia neg.: 100 %
	Total	43	239	282	

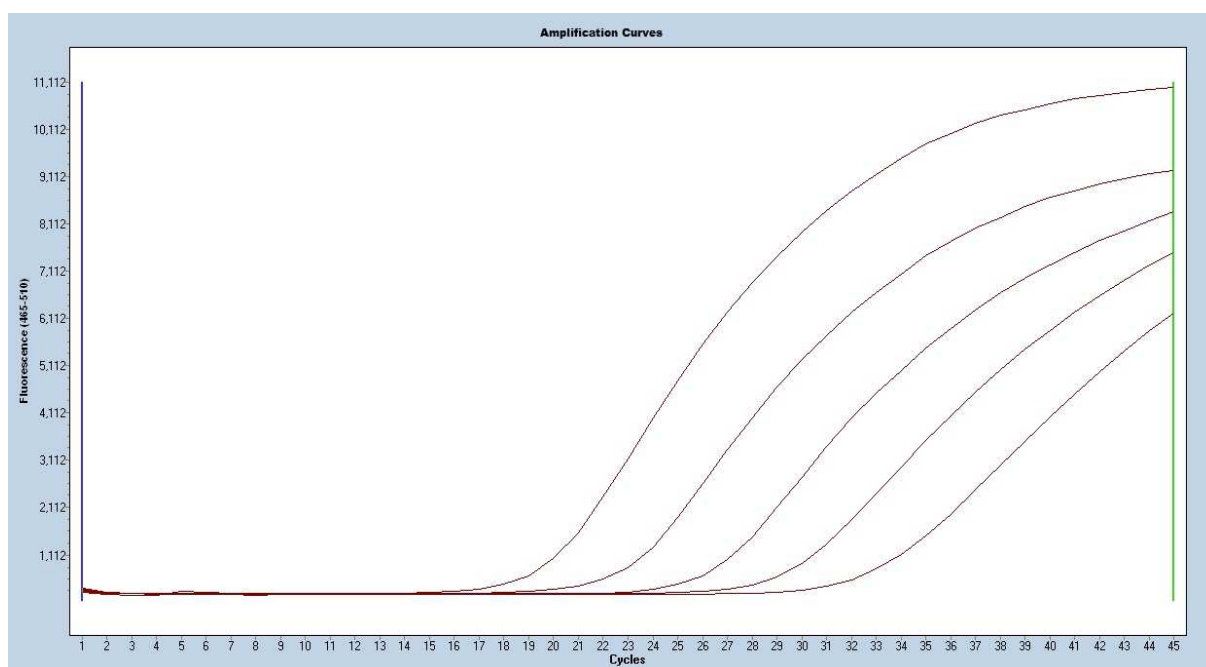
**Tabla 14:** Correlación de los resultados de *Campylobacter* spp. entre el ensayo de PCR en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel y el ensayo de PCR en tiempo real interno de referencia.

		Ensayo de PCR en tiempo real interno			Comentarios
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	41	1	42	Concordancia pos.: 82 %
	Negativo	9	231	240	Concordancia neg.: 100 %
	Total	50	232	282	

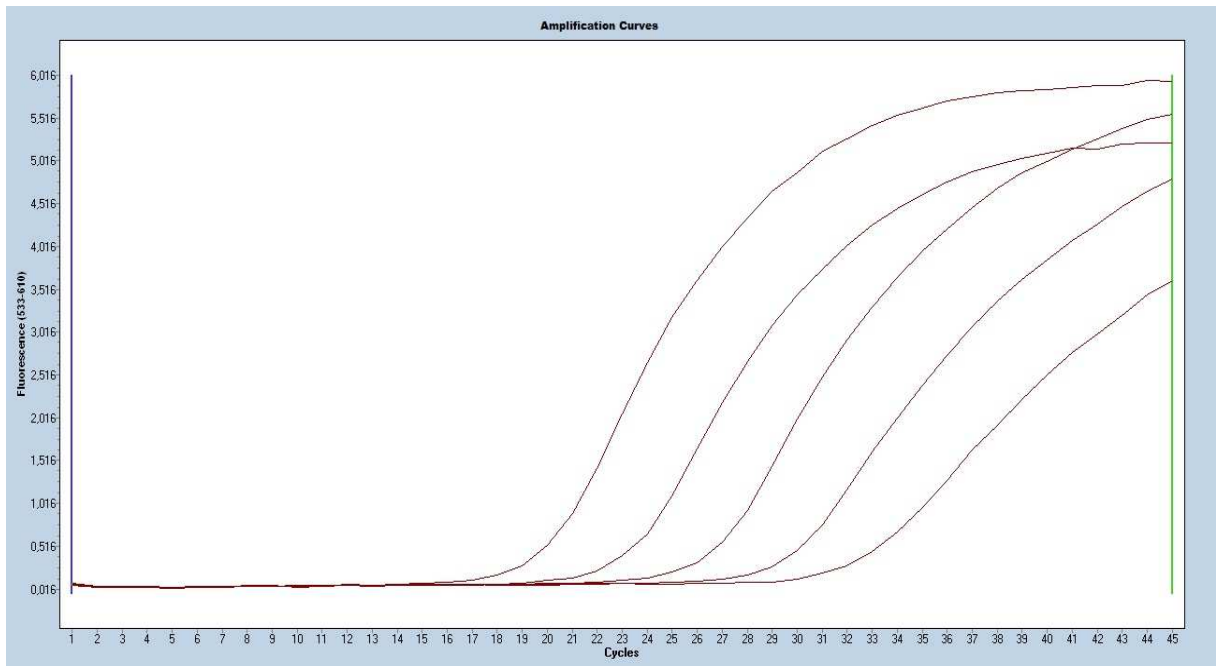
### 13.2 Sensibilidad analítica

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de ADN por reacción para *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica*.

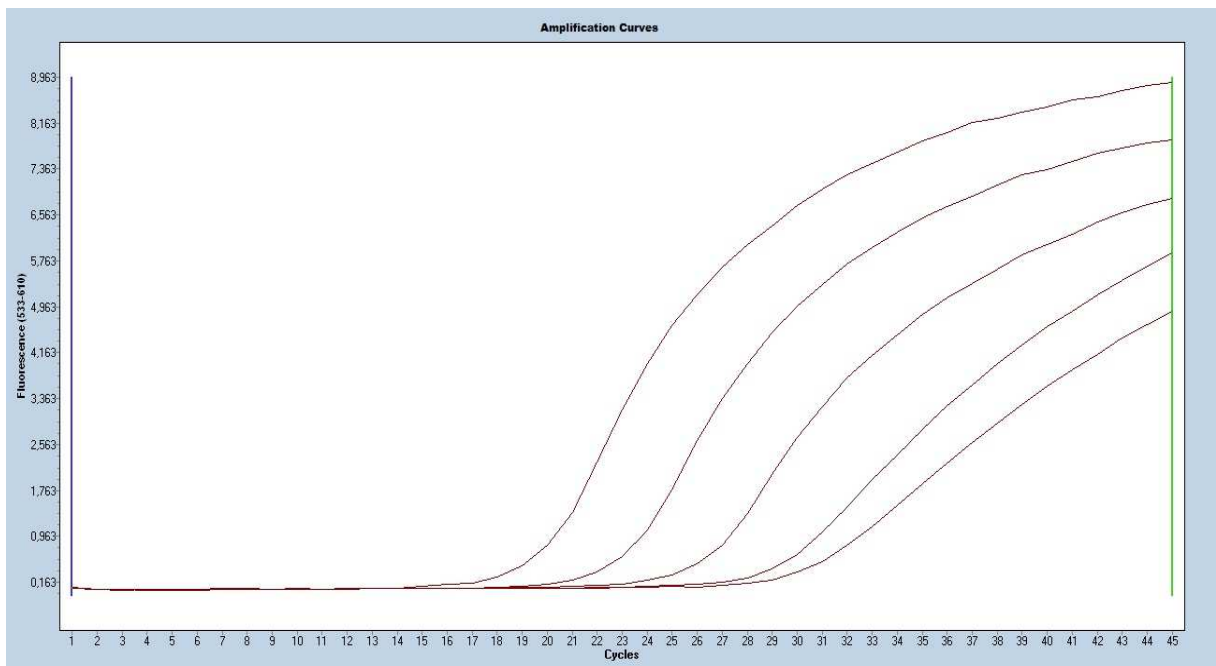
Las siguientes figuras 4, 5, 6 y 7 muestran una dilución seriada de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Yersinia enterocolitica* ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$  en cada caso) en el LightCycler® 480II.



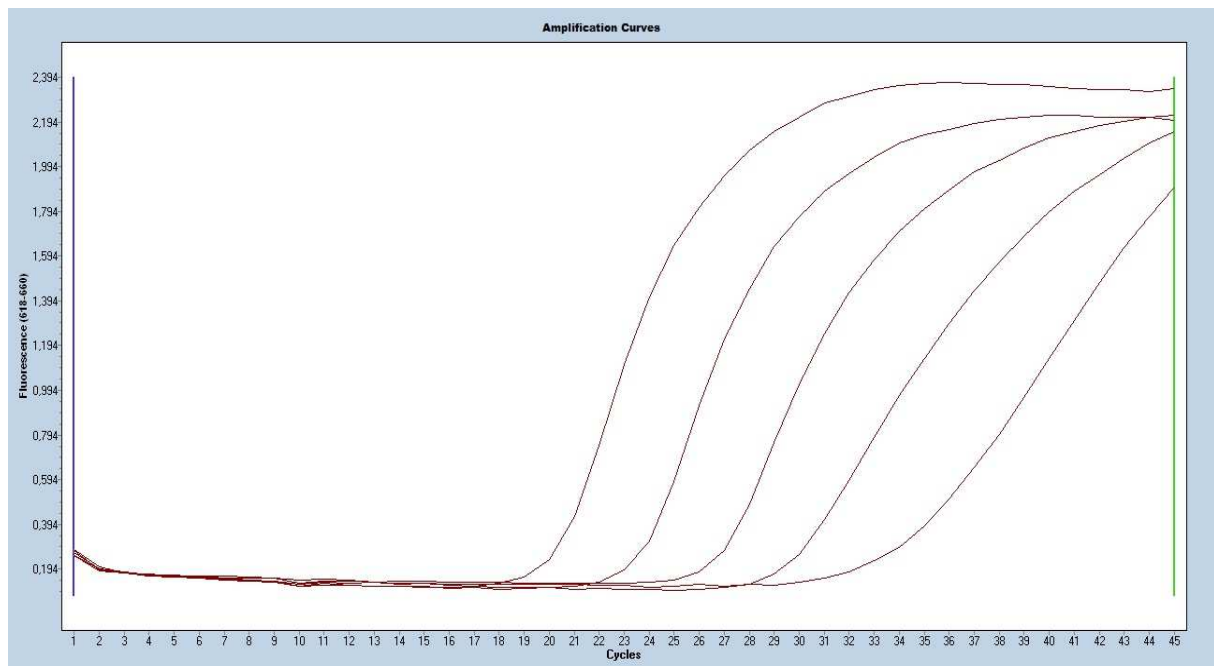
**Figura 4:** Dilución seriada de *Salmonella* spp. ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II



**Figura 5:** Dilución seriada de *Yersinia enterocolitica* (**ystA**) ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II



**Figura 6:** Dilución seriada de *Yersinia enterocolitica* (**ystB**) ( $10^5 - 10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II



**Figura 7:** Dilución seriada de *Campylobacter* spp. ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ADN por  $\mu$ l) en el LightCycler® 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

El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel es específico para *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). No se detectó reacción cruzada para las siguientes especies (consulte la tabla 15):

**Tabla 15:** Ensayos de reactividad cruzada

<b>Adenovirus 40</b>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<b><i>Yersinia frederiksenii</i></b>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<b><i>Yersinia kristensenii</i></b>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<b><i>Yersinia pseudotuberculosis</i></b>	-
<b><i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i></b>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<b><i>Yersinia rohdei</i></b>	-
<b><i>Campylobacter upsaliensis</i></b>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<b><i>Yersinia ruckeri</i></b>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, cepa Wa	-		

### 13.4 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel se evaluó contra serotipos múltiples de *Salmonella*, especies de *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica* (consulte la tabla 16). El ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Bacterial Stool Panel detectó todos los serotipos de *Salmonella*, especies de *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica* del panel.

**Tabla 16:** Pruebas de reactividad analítica










<b>Serotipos de <i>Salmonella</i></b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Especies de <i>Yersinia</i></b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> subespecie <i>palearctica</i>	+		
<b>Subespecies de <i>Campylobacter</i></b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-06-20	Versión anterior
2020-01-06	Revisión general 1. Uso previsto 3. Principio del ensayo 6. Reactivos necesarios no suministrados 9.3 Configuración del equipo de PCR 9.4 Configuración del canal de detección 10. Control de calidad 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento

## 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 ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

## 16. Bibliografía

1. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Pu*

## **RIDA®GENE Bacterial Stool Panel**

**REF** PG2405

### **1. Application**

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA®GENE Bacterial Stool Panel est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. Et *Yersinia enterocolitica* dans des échantillons de selles humaines.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel est destiné à faciliter le diagnostic des infections gastro-intestinales provoquées par des bactéries.

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

La maladie diarrhéique est un problème de santé majeur à l'origine d'environ 2 milliards de cas dans le monde. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe la maladie diarrhéique au deuxième rang des causes les plus fréquentes de décès d'enfants âgés de moins de 5 ans dans le monde, en particulier dans les pays en développement. Environ 1,9 million d'enfants âgés de moins de 5 ans meurent de maladie diarrhéique chaque année, davantage que par le sida, le paludisme et la rougeole réunis<sup>1,2</sup>. Les causes courantes de la maladie diarrhéique bactérienne sont *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Y. enterocolitica*.

Les espèces de *Campylobacter* représentent l'une des principales causes de diarrhée bactérienne dans le monde, responsables de 400 à 500 millions de cas par an. La maladie provoquée par le genre *Campylobacter* est appelée campylobactériose. Plus de 80 % des infections par *Campylobacter* sont provoquées par *C. jejuni*. Les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) estiment à plus de 2 millions le nombre de cas de campylobactériose par an aux États-Unis. Le réseau de surveillance des maladies d'origine alimentaire (FoodNet) a signalé un taux d'incidence de 13 cas pour 100 000 en 2008.

*C. jejuni* a été détecté chez 5 à 16 % des enfants atteints de diarrhée dans les pays développés et chez 8 à 45 % des enfants atteints de diarrhée dans les pays en développement<sup>4</sup>. Environ 100 personnes atteintes d'infection par *Campylobacter* meurent chaque année aux États-Unis<sup>3,4</sup>. L'infection par *Campylobacter* se transmet par les aliments contaminés, en particulier la volaille et l'eau, le contact avec des animaux contaminés ou par la voie oro-fécale, en particulier chez les enfants. La dose infectieuse de 500 bactéries est relativement faible. Après une période

d'incubation de 2 à 5 jours, les personnes atteintes de campylobactériose présentent de la fièvre, de la diarrhée, des crampes abdominales, des vomissements, des douleurs abdominales et des nausées. Les éventuelles complications à long terme sont les troubles auto-immuns, par exemple le syndrome de Guillain-Barré (GBS)<sup>4</sup>. Les espèces de *Salmonella* sont aussi l'une des principales causes de gastro-entérite bactérienne dans le monde. Le genre *Salmonella* comprend deux espèces, *S. enterica* et *S. bongori*. À ce jour, plus de 2 500 sérotypes de *Salmonella* pathogènes pour l'être humain ont été décrits. Les espèces de *Salmonella* provoquent une salmonellose non typhoïdique ou une fièvre typhoïde. On estime à 93,8 millions le nombre de cas de salmonellose non typhoïdique provoquant 155 000 décès dans le monde chaque année<sup>6</sup>. Le CDC estime à plus de 1,2 million le nombre de cas de salmonellose non typhoïdique chaque année aux États-Unis, avec plus de 23 000 hospitalisations et 450 décès<sup>5</sup>. La plupart des salmonelloses non typhoïdiques sont provoquées par *S. typhimurium* et *S. enteritidis*, alors que la fièvre typhoïde est provoquée par *S. typhi* et *S. paratyphi* A, B ou C. La transmission de *Salmonella* se fait par les aliments et l'eau contaminés ou le contact avec des animaux contaminés. La dose infectieuse des espèces de *Salmonella* varie de 1 à 1 000 bactéries. La salmonellose non typhoïdique se révèle après une période d'incubation de 6 à 72 h avec des symptômes cliniques de nausées, vomissements, crampes abdominales, diarrhée, fièvre et maux de tête. Les personnes atteintes de typhoïde présentent des maux de tête, des courbatures, une forte fièvre (de 39 à 41 °C), des symptômes gastro-intestinaux, y compris des douleurs abdominales et de la diarrhée dans les 1 à 3 semaines suivant l'exposition à l'organisme<sup>3,7</sup>. *Yersinia enterocolitica* est l'une des trois espèces du genre *Yersinia* susceptibles d'entraîner des maladies (les deux autres étant *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*). Pathogène pour l'être humain, elle est à l'origine de la maladie gastro-intestinale appelée yersiniose. FoodNet a signalé un taux d'incidence d'une infection par *Y. enterocolitica* pour 100 000 personnes chaque année aux États-Unis. Le Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies a rapporté 8 874 cas en 2007, dont 5 000 en Allemagne. L'infection appelée yersiniose se produit après l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. La dose infectieuse estimée se situe entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>6</sup> bactéries. Après une période d'incubation de 1 à 11 jours, les personnes atteintes de yersiniose présentent des diarrhées, des vomissements et des douleurs abdominales. *Y. enterocolitica* a également été associée à une arthrite réactive<sup>3,8</sup>. Pour établir le diagnostic de la diarrhée bactérienne en laboratoire, la méthode classique est la culture mais ce procédé nécessite plusieurs jours.

### 3. Principe du test

Le test RIDA®GENE Bacterial Stool Panel est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* dans des échantillons de selles humaines. Après isolation de l'ADN, on procède à l'amplification des fragments de gène spécifiques pour *Salmonella* spp. (*ttr*), *Campylobacter* spp. (ADNr 16S) et *Y. enterocolitica* (*ystA/ystB*), si présents. Les cibles amplifiées pour *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Y. enterocolitica* 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 Bacterial Stool Panel 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 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 les performances du test ne soient affectées (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. Réactifs requis, mais non fournis

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel 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
Instruments de PCR en temps réel	
R-Biopharm	RIDA®CYCLER
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](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler® 480II ou 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 usage diagnostique *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

### 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 de PCR en temps réel RIDA®GENE Bacterial Stool Panel contient 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'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** 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'en ajouter 20 µl 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.

## 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 le mélange réactif **Reaction Mix**, la **Taq-Polymerase**, le contrôle positif **Positive Control**, le contrôle sans matrice **No Template Control** et l'ADN de contrôle interne **Internal Control DNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 °C 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 contrôle sans matrice **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque:** 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 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 contrôle positif **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque:** 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 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 pour la série LightCycler® et Rotor-Gene Q et RIDA®CYCLER

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 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/ 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 ADN RIDA®GENE et ARN RIDA®GENE sont effectués lors d'une même exécution.**

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

<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
<b>R-Biopharm</b> <b>RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Vert	-
	ICD	Jaune	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rouge	
<b>Roche</b> <b>LightCycler®</b> <b>480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>Le RIDA®GENE Color Compensation kit IV (PG0004) est nécessaire</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche</b> <b>LightCycler®</b> <b>480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>Le RIDA®GENE Color Compensation kit IV (PG0004) est nécessaire</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn.</b> <b>Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI</b> 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad</b> <b>CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor-</b> <b>Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Vert	<b>Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut</b>
	ICD	Jaune	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	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 contrôle positif **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, respectivement.

**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	Non détectable

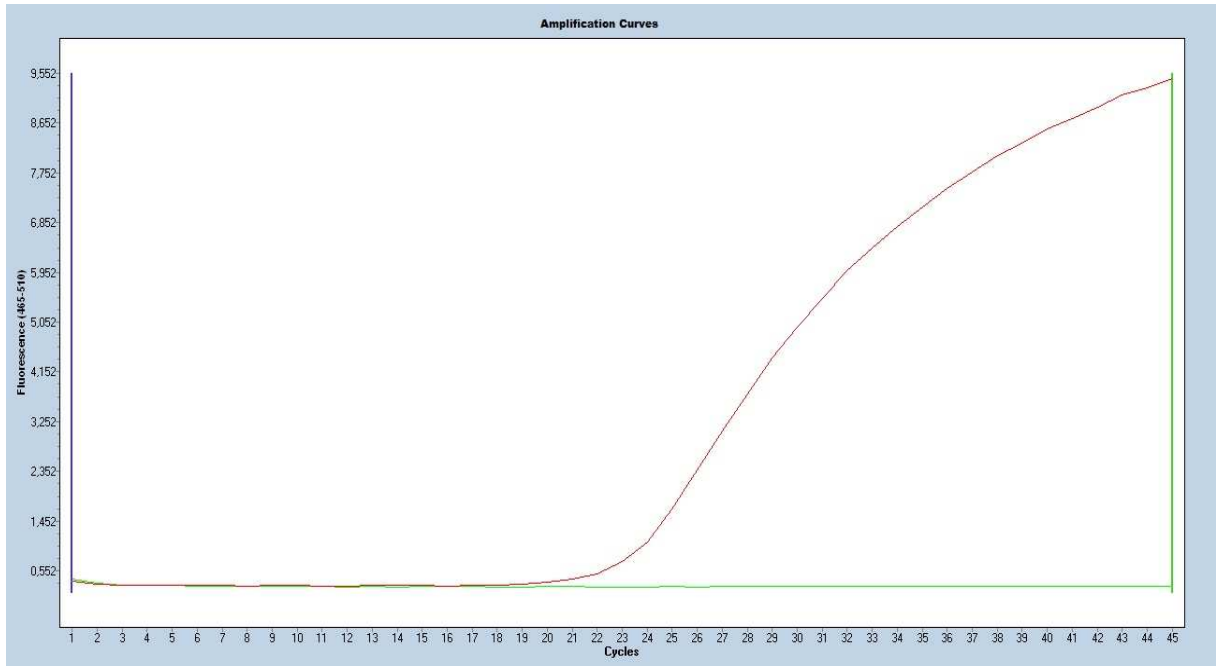
\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

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.

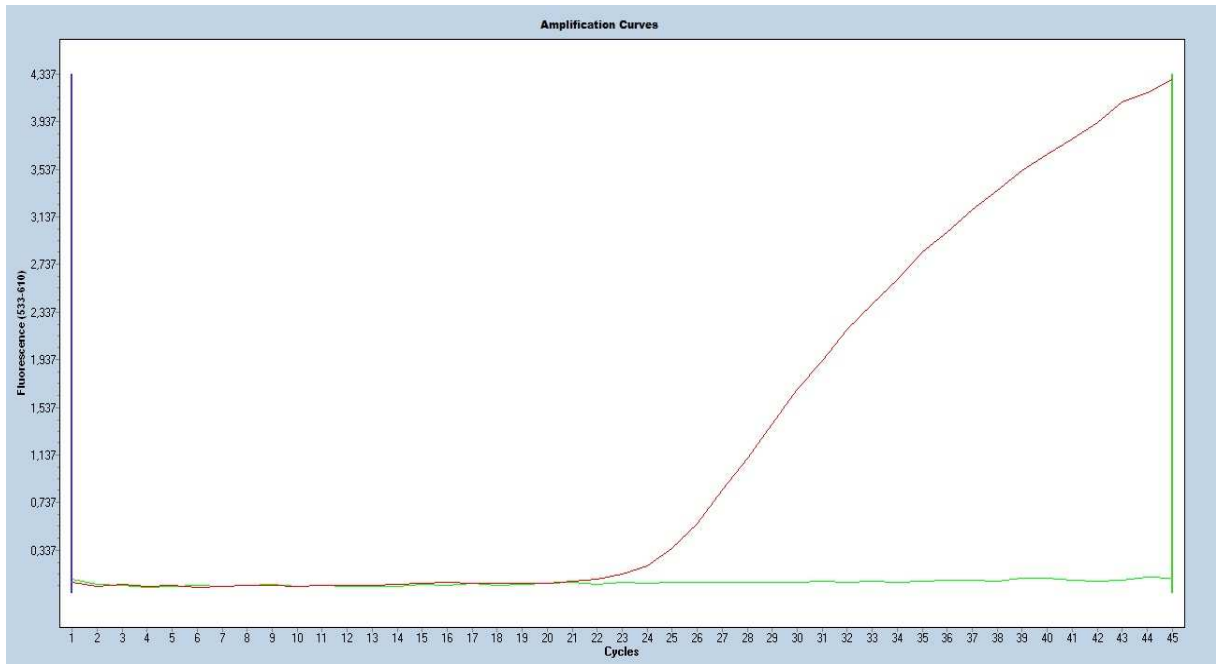
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

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

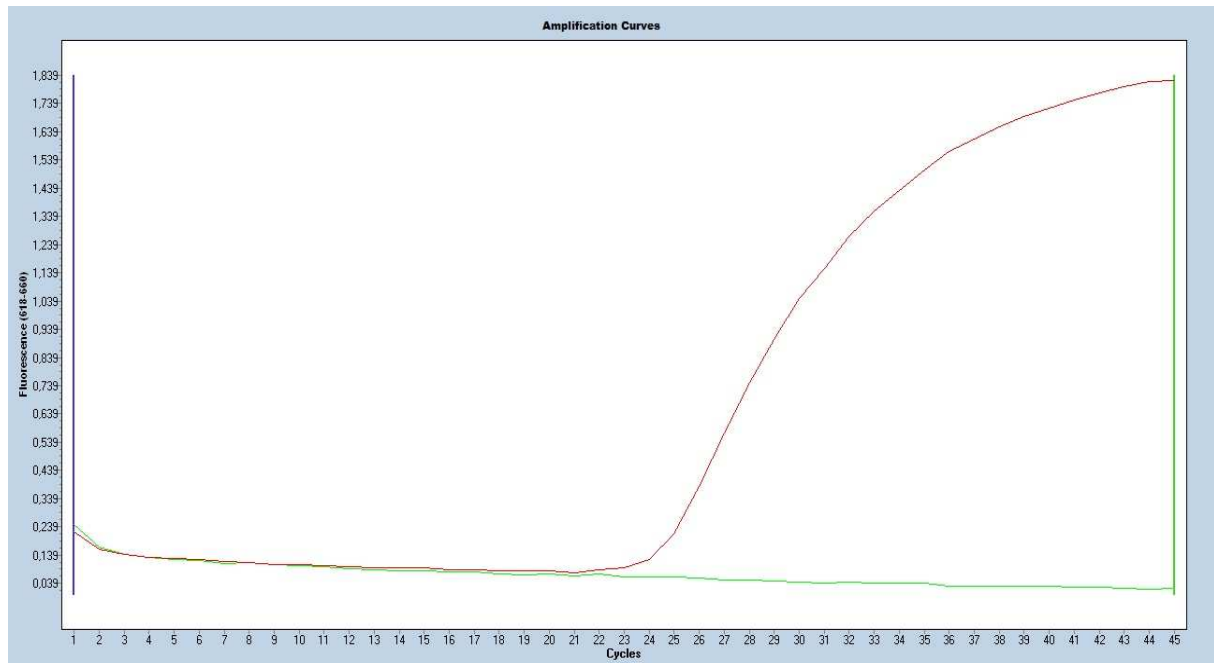


**Figure 1:** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Salmonella* spp.) sur le LightCycler® 480II



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





**Figure 3:** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Campylobacter* spp.) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11:** Interprétation des échantillons

Gènes cibles			ICD	Résultat
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
positif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp. détecté
négatif	positif	négatif	positif/négatif	<i>Yersinia enterocolitica</i> détecté
négatif	négatif	positif	positif/négatif	<i>Campylobacter</i> spp. détecté
positif	positif	négatif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp. et <i>Yersinia enterocolitica</i> détectés
positif	négatif	positif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp. et <i>Campylobacter</i> spp. détectés
négatif	positif	positif	positif/négatif	<i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Campylobacter</i> spp. détectés
positif	positif	positif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Campylobacter</i> spp. détectés
négatif	négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

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 aussi estimé positif s'il présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais que le Internal Control DNA est négatif. La détection du Internal Control DNA n'est pas nécessaire car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du Internal Control DNA.

Un échantillon est estimé négatif s'il ne montre aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais que 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 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 encore être 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 examiné dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
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® GENE Bacterial Stool Panel.
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 correspondants (*Salmonella* spp. (ttr), *Y. enterocolitica* (ystA/ystB), *Campylobacter* spp. (ADNr 16S uniquement *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)).
8. La mucine, l'azithromycine et l'acide stéarique/palmitique peuvent présenter des caractéristiques d'interférence même en petites quantités.

## 13. Performances

### 13.1 Performance clinique

Dans une étude de validation clinique rétrospective, 282 échantillons de selles extraits ont été analysés à l'aide du test RIDA®GENE Bacterial Stool Panel et d'un test de PCR en temps réel interne dans un laboratoire situé en dans les Pays-Bas.

**Tableau 12:** Corrélation des résultats de *Salmonella* spp. obtenus avec le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne			Commentaires
		Positif	Négatif	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positif	50	0	50	Corrélation positive: 100 %
	Négatif	0	232	232	Corrélation négative: 100 %
	Total	50	232	282	

**Tableau 13:** Corrélation des résultats de *Yersinia enterocolitica* obtenus avec le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne			Commentaires
		Positif	Négatif	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positif	33	0	33	Corrélation positive: 77 %
	Négatif	10	239	249	Corrélation négative: 100 %
	Total	43	239	282	

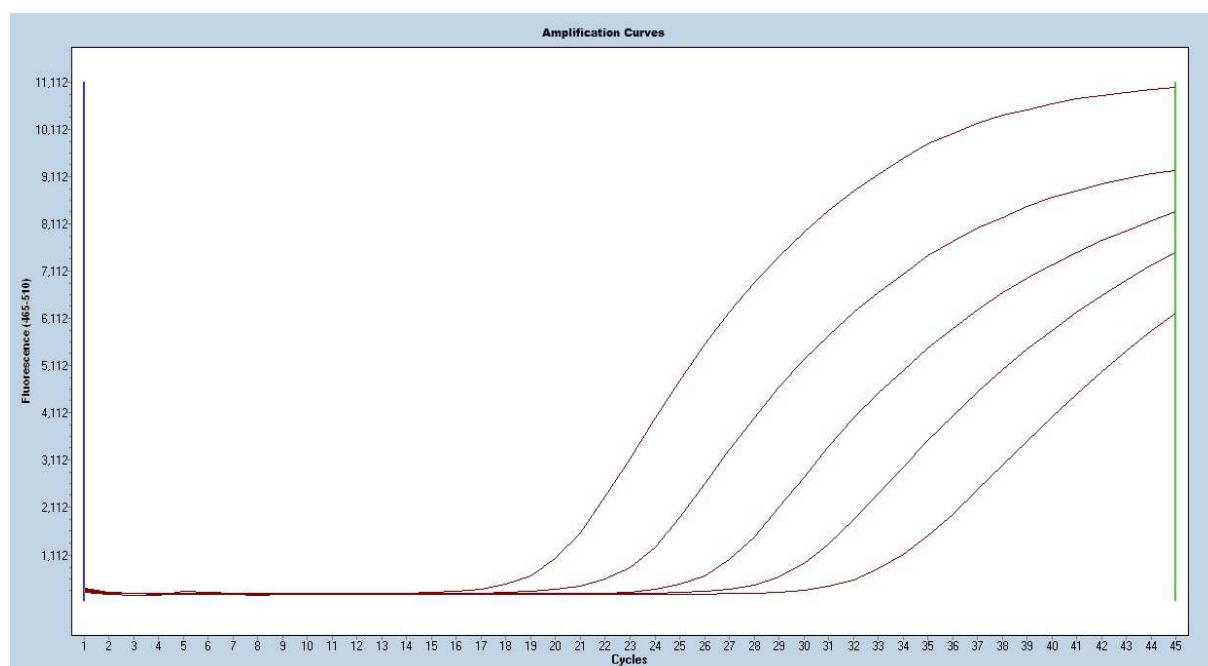
**Tableau 14:** Corrélation des résultats de *Campylobacter* spp.obtenus avec le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel et de la PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne			Commentaires
		Positif	Négatif	Total	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positif	41	1	42	Corrélation positive: 82 %
	Négatif	9	231	240	Corrélation négative: 100%
	Total	50	232	282	

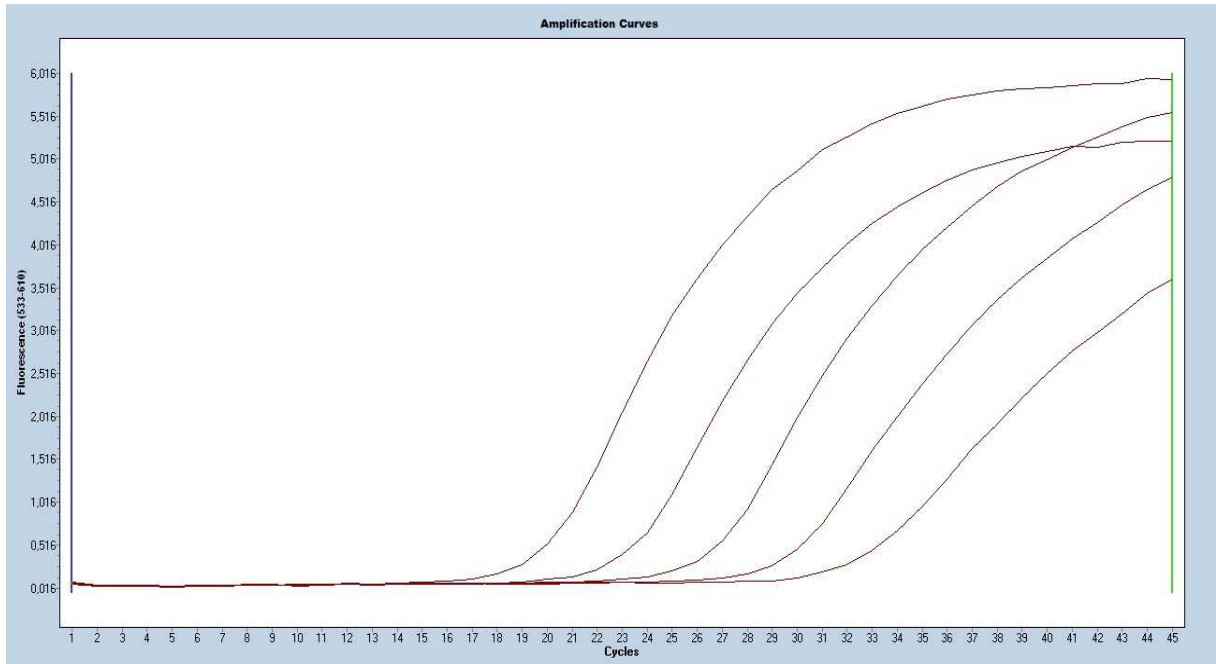
### 13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel est  $\geq 10$  copies d'ADN par réaction pour *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica*.

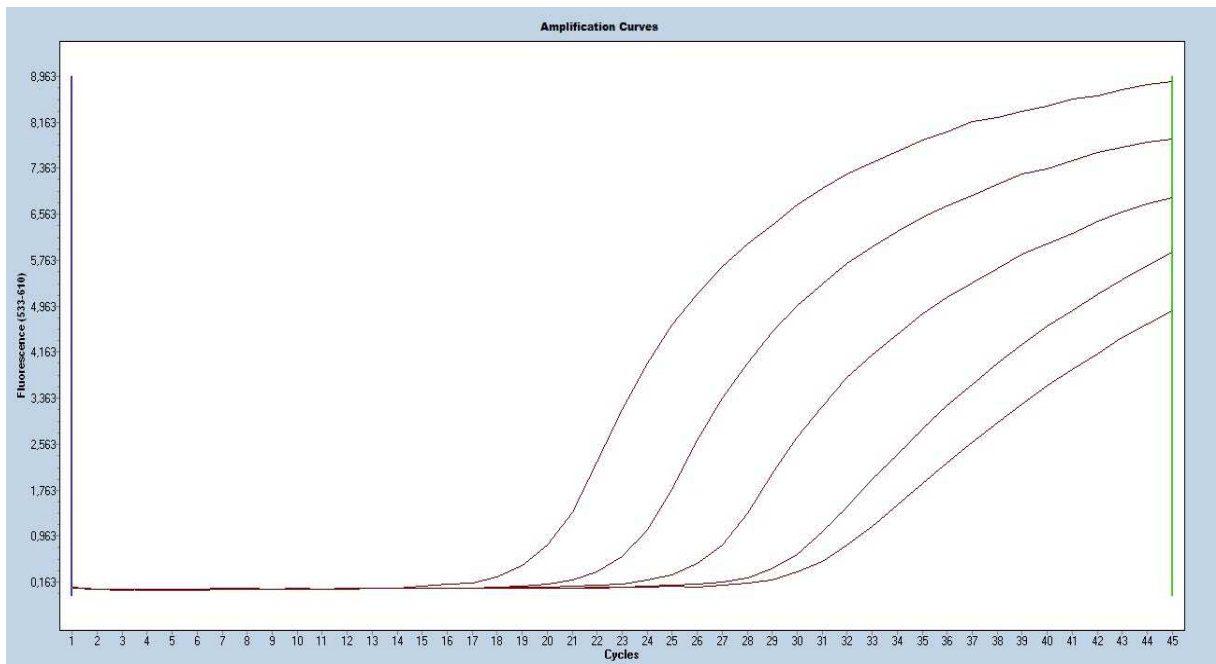
Les figures 4, 5, 6 et 7 suivantes montrent les séries de dilution de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$  chacune) avec le LightCycler® 480II.



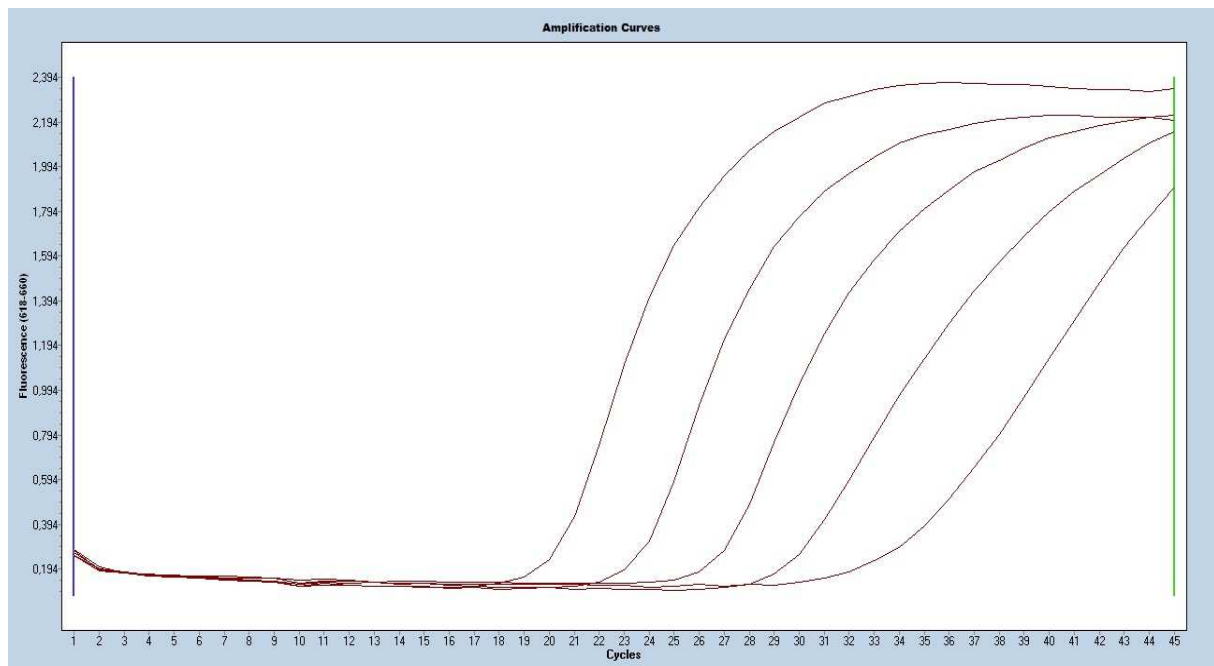
**Figure 4:** Série de dilutions pour *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II



**Figure 5:** Série de dilutions pour *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) (10<sup>5</sup> – 10<sup>1</sup> copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II



**Figure 6:** Série de dilutions pour *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) (10<sup>5</sup> – 10<sup>1</sup> copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II



**Figure 7:** Série de dilutions pour *Campylobacter* spp. ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) 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.

### 13.3 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel est spécifique pour *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 15):

**Tableau 15:** Test de la réactivité croisée

Adénovirus 40	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia frederiksenii</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia kristensenii</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia rohdei</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Yersinia ruckeri</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, souche Wa	-		



### 13.4 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel a été évaluée par rapport à plusieurs sérotypes de *Salmonella*, et espèces de *Yersinia enterocolitica* et de *Campylobacter* (voir tableau 16). Tous les sérotypes de *Salmonella* et les espèces de *Yersinia enterocolitica* et de *Campylobacter* du panel ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bacterial Stool Panel.

**Tableau 16:** Test de la réactivité analytique










<b>Sérotypes de Salmonella</b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. Bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. Dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Espèces de Yersinia</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> sous-esp. <i>palaearctica</i>	+		
<b>Sous- espèce Campylobacter</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-06-20	Version précédente
2020-01-06	Révision générale 1. Application 3. Principe du test 6. Réactifs requis, mais non fournis 9.3 Configuration de l'instrument de PCR 9.4 Configuration du canal de détection 10. Contrôle qualité 12. Limites de la méthode 13. Performances

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>
	Consulter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Utiliser avant le
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

### Symboles spécifiques au test

Sans objet

## 16. Bibliographie

1. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.



# RIDA®GENE Bacterial Stool Panel

**REF** PG2405

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è un test di PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani.

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel deve essere usato come ausilio nella diagnosi delle infezioni gastrointestinali causate da batteri.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

La diarrea è un problema sanitario grave e causa circa due miliardi di casi in tutto il mondo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) classifica la diarrea quale seconda causa più frequente di decesso nei bambini di età inferiore ai 5 anni in tutto il mondo, in particolare nei Paesi in via di sviluppo. Ogni anno circa 1,9 milioni di bambini di età inferiore ai 5 anni muoiono di diarrea, più che di AIDS, malaria e morbillo insieme.<sup>1,2</sup> Tra le cause comuni di diarrea batterica vi sono *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., nonché *Y. enterocolitica*.

Le specie di *Campylobacter* sono una delle cause più comuni di diarrea in tutto il mondo e sono responsabili di 400-500 milioni di casi all'anno. La malattia causata dal genere *Campylobacter* è definita campylobatteriosi. Oltre l'80% delle infezioni da *Campylobacter* sono causate da *C. jejuni*. I Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie (Centers for Disease Control and Prevention, abbreviati in CDC) stimano che negli Stati Uniti vi siano oltre due milioni di casi di campylobatteriosi ogni anno. La Rete di sorveglianza attiva delle malattie di origine alimentare (Foodborne Diseases Active Surveillance Network, abbreviato in FoodNet) ha riferito un tasso di incidenza di 13 casi ogni 100.000 individui nel 2008.

La presenza di *C. jejuni* è stata rivelata nel 5-16% dei bambini con diarrea nei paesi sviluppati e nell'8-45% dei bambini con diarrea nei paesi in via di sviluppo.<sup>4</sup> Ogni anno circa 100 persone affette da infezione da *Campylobacter* muoiono negli Stati Uniti.<sup>3,4</sup> L'infezione da *Campylobacter* si contrae attraverso il cibo contaminato, soprattutto pollame, acqua, contatto con animali infetti o per via oro-fecale, in particolare nei bambini. La dose infettiva pari a 500 batteri è relativamente bassa. Dopo un periodo di incubazione di 2-5 giorni, i soggetti con campylobatteriosi accusano febbre, diarrea, crampi addominali, vomito, dolore addominale e nausea.

Le potenziali complicazioni a lungo termine sono disturbi autoimmuni, ad esempio la sindrome di Guillain-Barré (GBS).<sup>4</sup>

Anche le specie di *Salmonella* sono una delle principali cause di gastroenterite in tutto il mondo. Il genere *Salmonella* si divide in due specie: *S. enterica* e *S. bongori*. Fino a oggi sono stati descritti oltre 2.500 sierotipi di *Salmonella* patogeni per l'uomo. Le specie di *Salmonella* causano salmonellosi non tifoidea o febbre tifoide. Si stima che ogni anno in tutto il mondo si verifichino 93,8 milioni di casi di infezione da salmonellosi non tifoidea con 155.000 decessi.<sup>6</sup> Secondo le stime del CDC, ogni anno negli Stati Uniti vi sono oltre 1,2 milioni di casi di infezione da salmonellosi tifoidea, con oltre 23.000 ricoveri ospedalieri e 450 decessi.<sup>5</sup> La maggior parte delle infezioni da salmonellosi non tifoidea è causata da *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, mentre la febbre tifoidea è causata da *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B or C. La trasmissione della *Salmonella* avviene tramite cibo e acqua contaminati o contatto con animali infetti. La dose infettiva delle specie di *Salmonella* varia da 1 a 1000 batteri. L'infezione da salmonellosi non tifoidea si sviluppa dopo un periodo di incubazione di 6-72 ore e i sintomi clinici sono nausea, vomito, crampi addominali, diarrea, febbre e mal di testa. I soggetti con febbre tifoidea accusano mal di testa, dolorabilità, febbre alta (da 39 °C a 41 °C), sintomi gastrointestinali tra cui dolori addominali e diarrea entro 1-3 settimane dopo l'esposizione all'organismo.<sup>3,7</sup>

*Yersinia enterocolitica* è una delle tre specie di *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) del genere *Yersinia* che sono patogene per l'uomo e causa della malattia gastrointestinale chiamata yersiniosi. Secondo FoodNet, ogni anno negli Stati Uniti si registra un tasso di incidenza di 1 infezione da *Y. enterocolitica* ogni 100.000 persone. Il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie ha segnalato 8.874 casi nel 2007, di cui circa 5.000 provenienti dalla Germania. L'infezione da *Yersinia* si verifica in seguito all'ingestione di cibo o acqua contaminati. La dose infettiva stimata è compresa tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> batteri. Dopo un periodo di incubazione da 1 a 11 giorni, i soggetti con yersiniosi soffrono di diarrea, vomito e dolori addominali. *Y. enterocolitica* è stata anche associata con l'artrite reattiva.<sup>3,8</sup> La coltura è il metodo classico per stabilire la diagnosi di laboratorio della diarrea batterica, ma richiede diversi giorni.

### 3. Principio del test

RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è un test di PCR multiplex real-time per la rivelazione qualitativa diretta di *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* in campioni fecali umani. Dopo l'isolamento del DNA, viene eseguita l'amplificazione dei frammenti genetici specifici per *Salmonella* spp. (*ttr*), *Campylobacter* spp. (16S rDNA) e *Y. enterocolitica* (*ystA/ystB*), se presenti. I target amplificati per *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ed *Y. enterocolitica* vengono rilevati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante rivelatore 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®GENE Bacterial Stool Panel contiene un **Internal Control DNA** (ICD) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della 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.
- Scongela accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelo senza compromettere i test (ad esempio, dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati in ambiente freddo, in modo appropriato (2 - 8 °C).

## 6. Reagenti necessari ma non in dotazione

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

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

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

**Nota: 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 IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II e LightCycler® 480 z
- 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 (acqua di grado bioscientifico, priva di nucleasi)



## 7. Avvertenze e misure precauzionali

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 manipolano i campioni o i reagenti.
- 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

### 8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA da campioni di feci umane utilizzare un kit (ad es. RIDA®Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione disponibile in commercio (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre il DNA in base alle istruzioni del produttore.

Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni fecali con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 giri per 30 s. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il kit per PCR real-time RIDA®GENE Bacterial Stool Panel contiene un **Internal Control DNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e conferma che l'estrazione dell'acido nucleico è 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.

## 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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Taq-Polymerase</b>	0,7 µl	7,7 µl
D	<b>Internal Control DNA</b>	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.

**Nota:** 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 di controllo negativo.

**Campione:** Dispensare 5 µl di DNA Extract alla Master Mix pre-pipettata.

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

**Nota:** 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 di controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione 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 per la serie LightCycler® e Rotor-Gene Q e **RIDA®CYCLER**

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

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

**Tabella 6:** Profilo PCR real-time per Mx3005P, ABI 7500 e 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

**Nota:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase

### 9.3.2 Profilo per PCR real-time universale

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

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

<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

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

**Tabella 8:** Profilo PCR real-time universale per Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<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

**Nota:** 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
<b>R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	-
	ICD	Giallo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Arancione	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rosso	
<b>Roche LightCycler® 480II</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation È necessario il kit IV (PG0004)</b>
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Roche LightCycler® 480 z</b>	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation È necessario il kit IV (PG0004)</b>
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Controllare che non vi sia colorante di riferimento</b>
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	<b>Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno</b>
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
<b>Qiagen Rotor- Gene Q</b>	<i>Salmonella</i> spp.	Verde	<b>Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite</b>
	ICD	Giallo	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Arancione	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rosso	

## 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, occorre che i controlli positivo e negativo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 10, Figura 1, Figura 2, Figura 3).

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, rispettivamente.

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

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Positive Control	Positivo	NA *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	Non rivelabile

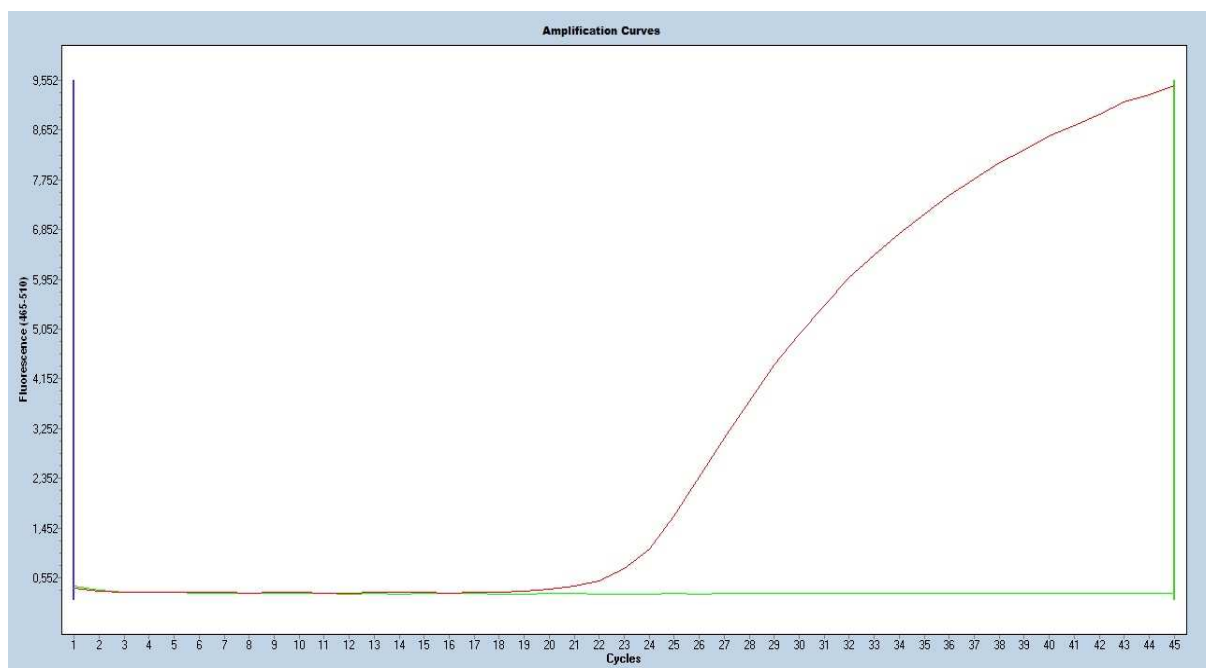
\*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICD.

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.

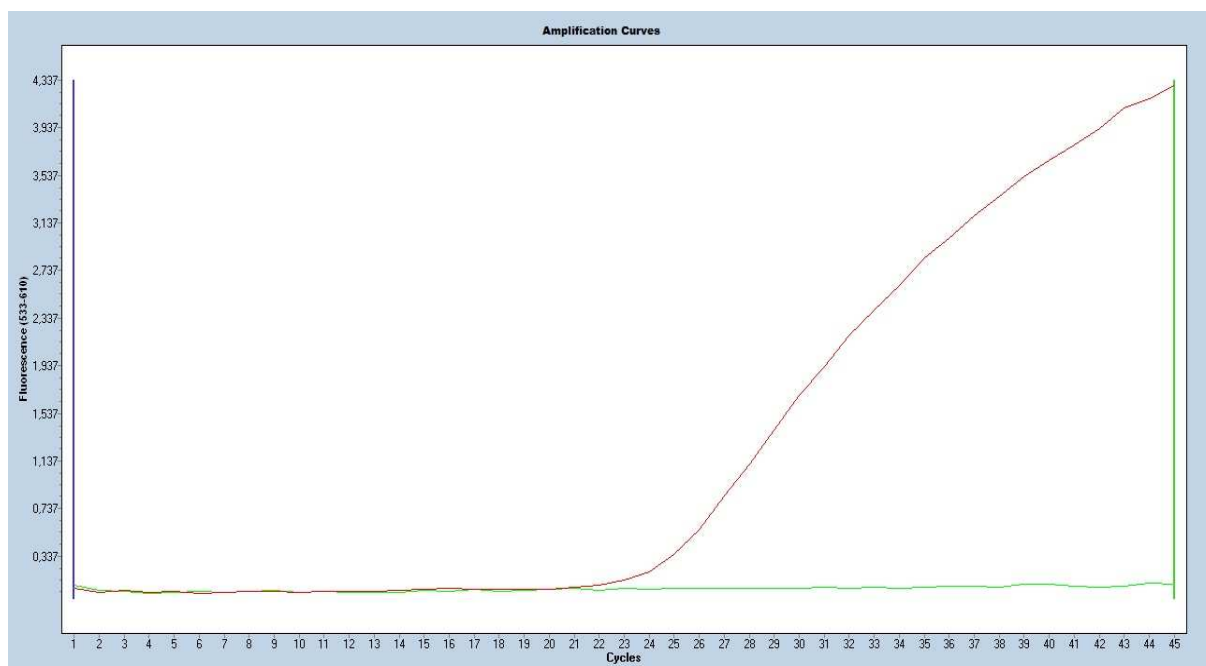
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

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

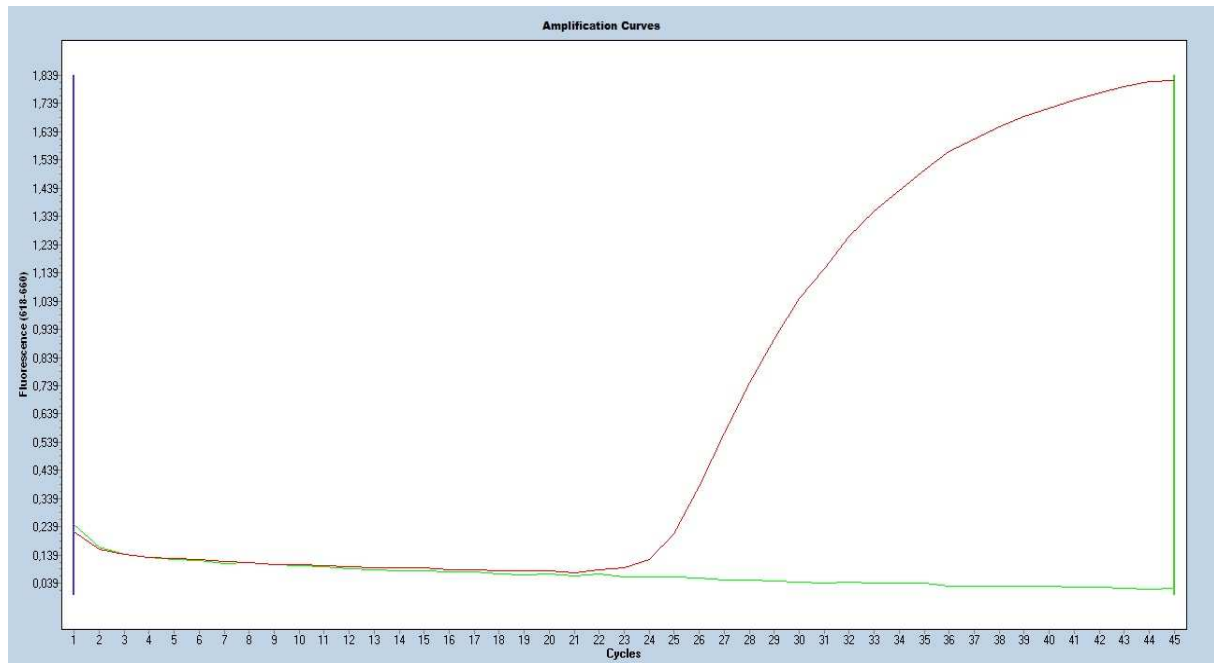
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Salmonella* spp.) sul LightCycler® 480II



**Figura 2:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Yersinia enterocolitica*) sul LightCycler® 480II



**Figura 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (*Campylobacter* spp.) sul LightCycler® 480II



## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 11.

**Tabella 11:** Interpretazione del campione

Geni target			ICD	Risultato
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. rivelato</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> rivelato</b>
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp. rivelato</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. e <i>Yersinia enterocolitica</i> rivelati</b>
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp. e <i>Campylobacter</i> spp. rivelati</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. rivelati</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b><i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Campylobacter</i> spp. rivelati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Geni target non rivelati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Negativo</b>	<b>Non valido</b>

Un campione è valutato come positivo se sia il campione sia l'**Internal Control DNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato come positivo anche se mostra un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l'**Internal Control DNA** è negativo. La rivelazione dell'**Internal Control DNA** non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control DNA** sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se non mostra alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione, ma l'**Internal Control DNA** è positivo. L'inibizione della reazione PCR o un errore nella procedura di estrazione possono essere esclusi dalla rivelazione di **Internal Control DNA**.

Un campione è valutato come non valido se sia il campione sia l'**Internal Control DNA** non mostrano alcun segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione conteneva 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 convalidato solo per campioni di feci.
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 Bacterial Stool Panel.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rilevazione (LoD) possono essere rilevati, 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 dei geni target corrispondenti (*Salmonella* spp. (ttr), *Y. enterocolitica* (ystA/ystB), *Campylobacter* spp. (16S rDNA solo *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)).
8. Mucina, azitromicina e acido stearico/palmitico possono mostrare proprietà di interferenza anche in piccole quantità.

## 13. Prestazioni e caratteristiche

### 13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio di validazione clinica retrospettiva condotto presso un laboratorio in Olanda abbiamo analizzato 282 campioni fecali con il test RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con un test PCR real-time interno.

**Tab. 12:** Confronto tra i risultati relativi allo *Salmonella* spp. con PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			Commenti
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	50	0	50	Concordanza pos.:100 %
	Negativo	0	232	232	Concordanza neg.:100 %
	Totale	50	232	282	

**Tab. 13:** Confronto tra i risultati relativi allo *Yersinia enterocolitica* con PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			Commenti
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	33	0	33	Concordanza pos.:77 %
	Negativo	10	239	249	Concordanza neg.:100 %
	Totale	43	239	282	

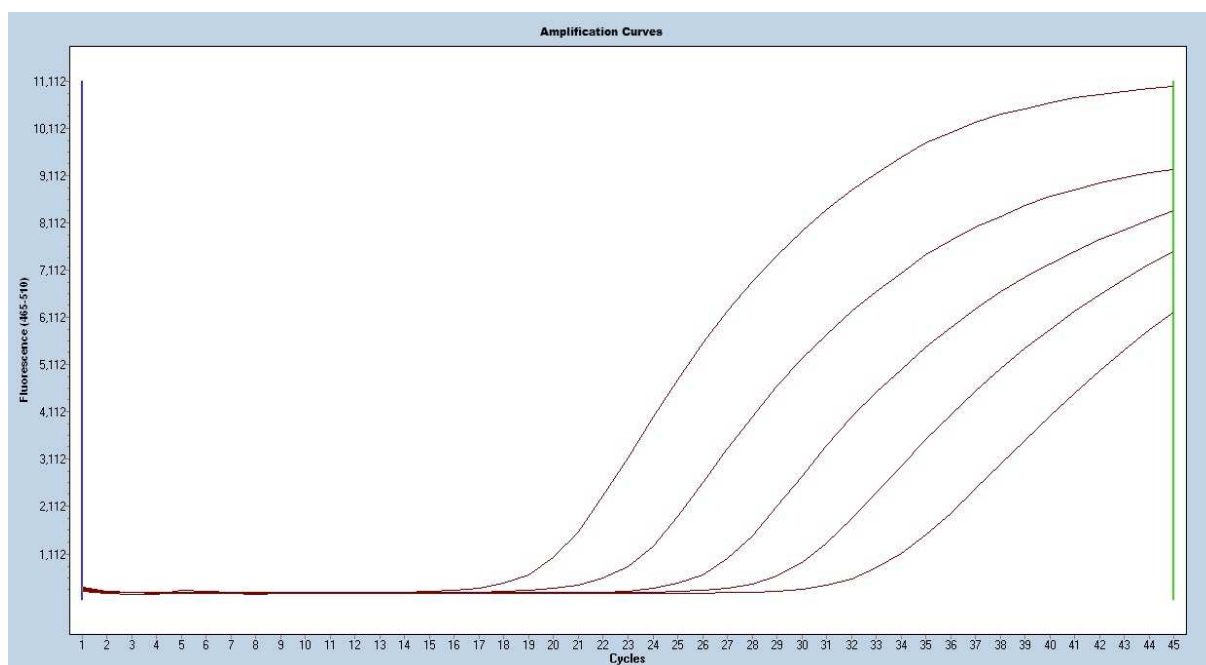
**Tab. 14:** Confronto tra i risultati relativi allo *Campylobacter* spp. con PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel e con il test di PCR real-time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			Commenti
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA®GENE Bacterial Stool Panel	Positivo	41	1	42	Concordanza pos.:82 %
	Negativo	9	231	240	Concordanza neg.:100 %
	Totale	50	232	282	

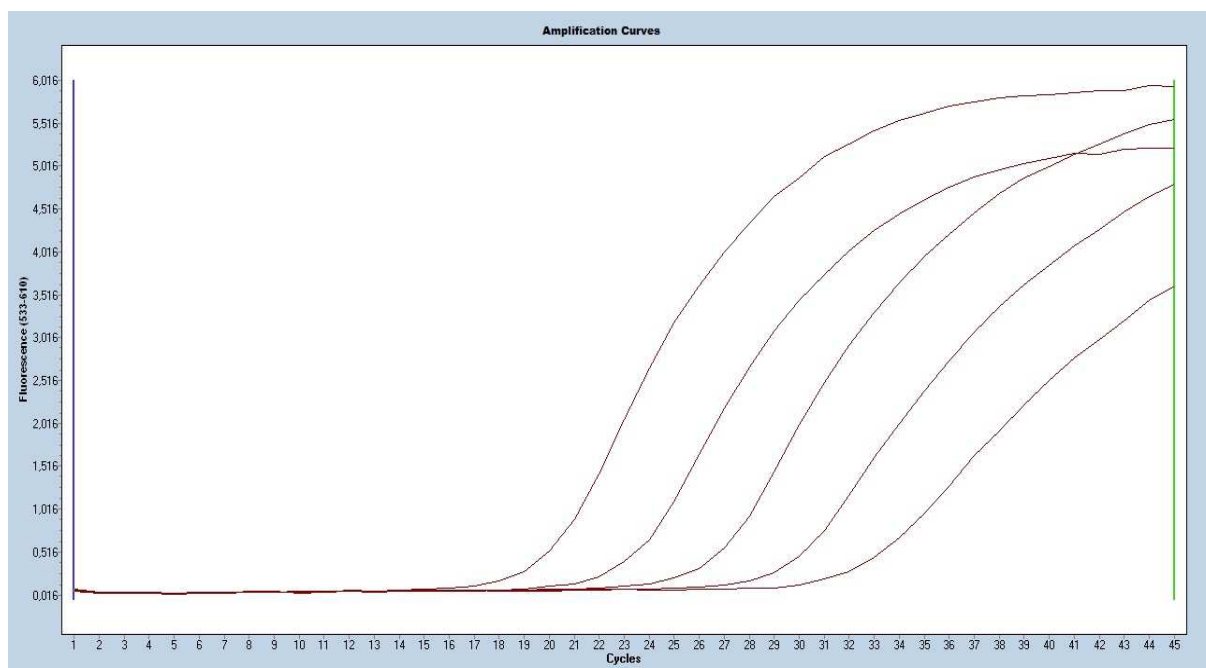
### 13.2 Sensibilità analitica

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel ha un limite di rivelazione  $\geq 10$  copie di DNA per reazione per *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*.

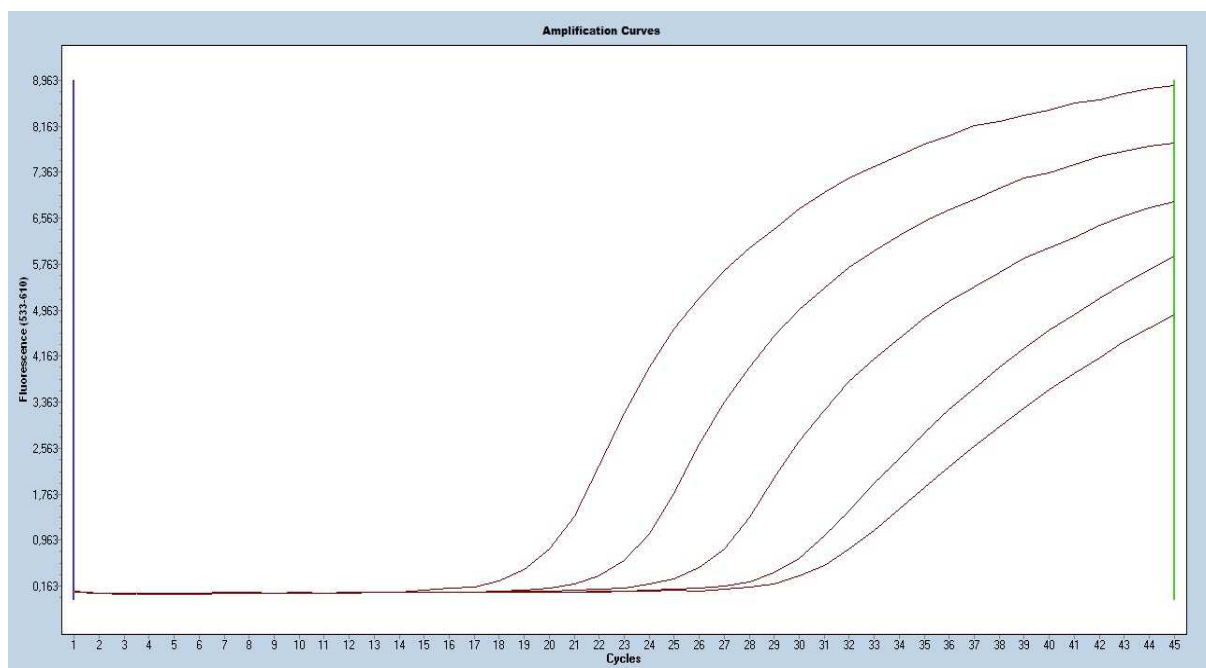
Le figure 4, 5, 6 e 7 seguenti mostrano le serie di diluizioni di *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Yersinia enterocolitica* (ciascuno  $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II.



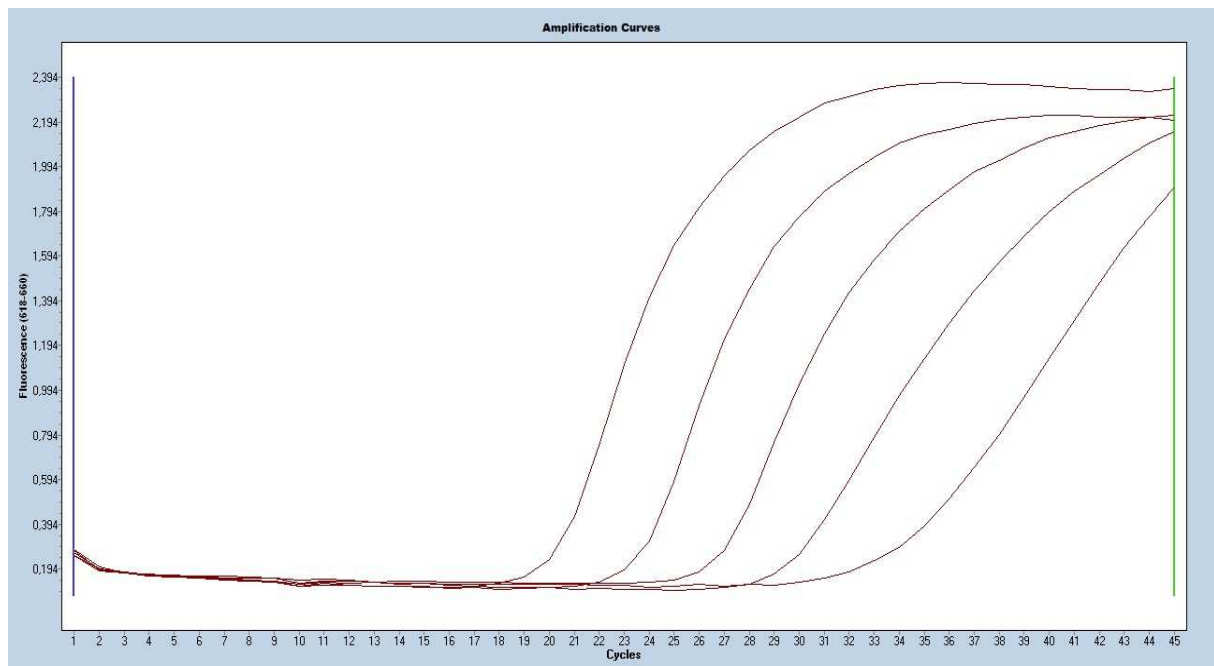
**Figura 4:** Serie di diluizione di *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 480II



**Figura 5:** Serie di diluizioni di *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ( $10^5$ -  $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Figura 6:** Serie di diluizioni di *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ( $10^5$ -  $10^1$  copie di DNA per  $\mu$ l) sul LightCycler® 480II



**Figura 7:** Serie di diluizione di *Campylobacter* spp. ( $10^5$ –  $10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler® 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

Il test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è specifico per *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*). Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 15):

**Tabella 15:** Test di reattività crociata

<b>Adenovirus 40</b>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<b><i>Yersinia frederiksenii</i></b>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	Norovirus GG I	-	<b><i>Yersinia kristensenii</i></b>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG II	-	<b><i>Yersinia pseudotuberculosis</i></b>	-
<b><i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i></b>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<b><i>Yersinia rohdei</i></b>	-
<b><i>Campylobacter upsaliensis</i></b>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<b><i>Yersinia ruckeri</i></b>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Rotavirus, ceppo Wa	-		

### 13.4 Reattività analitica

La reattività del test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel è stata testata su più sierotipi di *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* spp. (vedere Tabella 16). Tutti i sierotipi di *Salmonella*, le specie di *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* del panel sono stati rivelati dal test di PCR real-time multiplex RIDA®GENE Bacterial Stool Panel.

**Tabella 16:** Test di reattività analitica

<b>Sierotipi di Salmonella</b>					
<i>S. abony</i>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<i>S. paratyphi B</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. javiana</i>	+	<i>S. paratyphi C</i>	+
<i>S. Bareilly</i>	+	<i>S. kedougou</i>	+	<i>S. saintpaul</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. mississippi</i>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. choleraesuis</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<i>S. typhi</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<i>S. diarizonae</i>	+	<i>S. newport</i>	+	<i>S. worthington</i>	+
<i>S. Dublin</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+		
<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. ohio</i>	+		
<b>Specie di Yersinia</b>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y. enterocolitica</i> sottosp. <i>palearctica</i>	+		
<b>Sottospecie di Campylobacter</b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. lari</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+












## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-06-20	Versione precedente
2020-01-06	Revisione generale 1. Campo di applicazione 3. Principio del test 6. Reagenti necessari ma non in dotazione 9.3 Impostazione dello strumento per PCR 9.4 Impostazione del canale di rivelazione 10. Controllo qualità 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere le istruzioni per l'uso
	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. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Acute diarrhea in adults and children: a global perspective.
2. UNICEF/WHO. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009.
3. FDA. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook 2012.
4. Ruiz-Palacios GM. The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance: playing chicken. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44:701–703.
5. CDC. National Salmonella Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.
6. Majowicz SE *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:882–889.
7. Pui CF *et al.* *Salmonella*: A foodborne pathogen. Review Article. *International Food Research Journal* 2011; 18: 465-473.
8. Rosner BM *et al.* Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health* 2010; 10:337.