

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^{1,2}. 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 développement⁴. Environ 100 personnes atteintes d'infection par *Campylobacter* meurent chaque année aux États-Unis^{3,4}. 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)⁴. 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 année⁶. 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 décès⁵. 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^{3,7}.

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 10⁴ et 10⁶ 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^{3,8}.

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.

- 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.

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
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

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

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

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la PCR

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

Contrôle négatif: Ajouter 5 µl de 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
R-Biopharm RIDA®CYCLER	<i>Salmonella</i> spp.	Vert	-
	ICD	Jaune	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Orange	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Rouge	
Roche LightCycler® 480II	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	540/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
ABI 7500	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	
Qiagen Rotor- Gene Q	<i>Salmonella</i> spp.	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	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/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 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

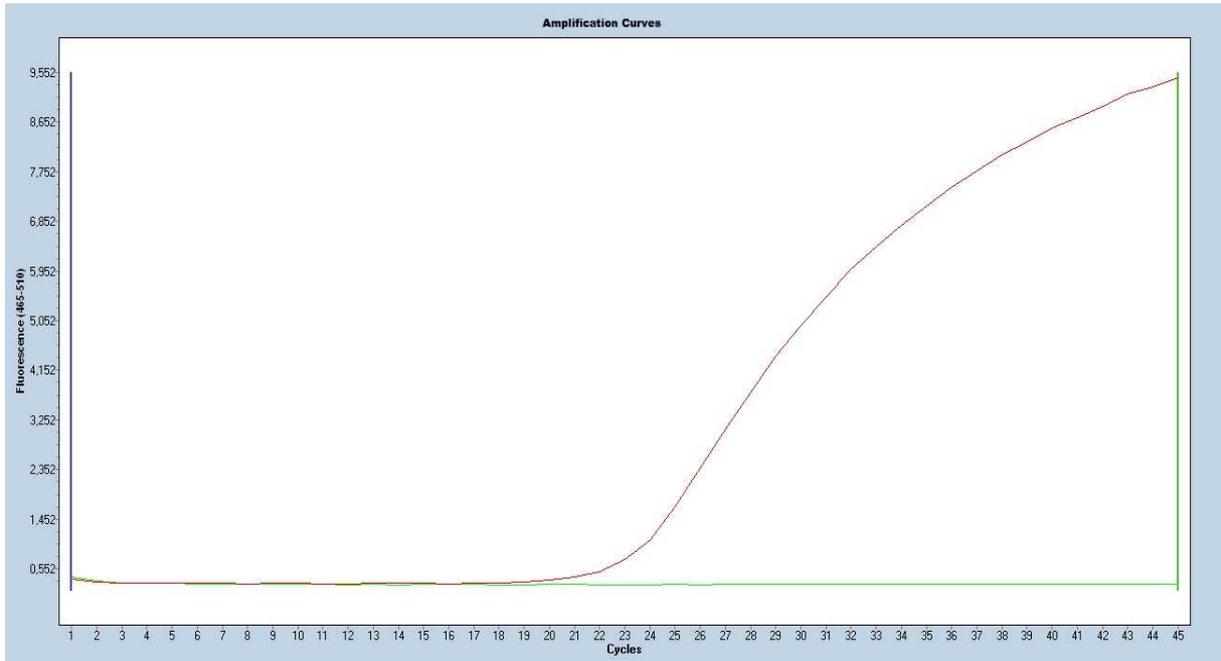


Figure 1: Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Salmonella* spp.) sur le LightCycler® 480II

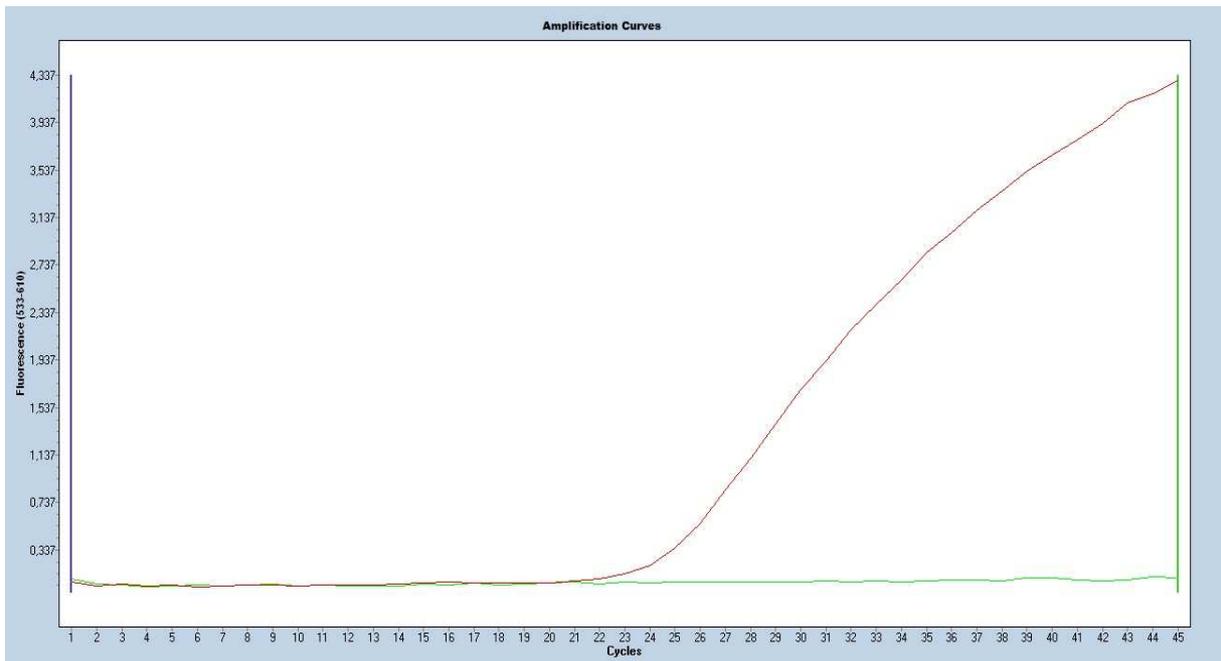


Figure 2: Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Yersinia enterocolitica*) sur le LightCycler® 480II

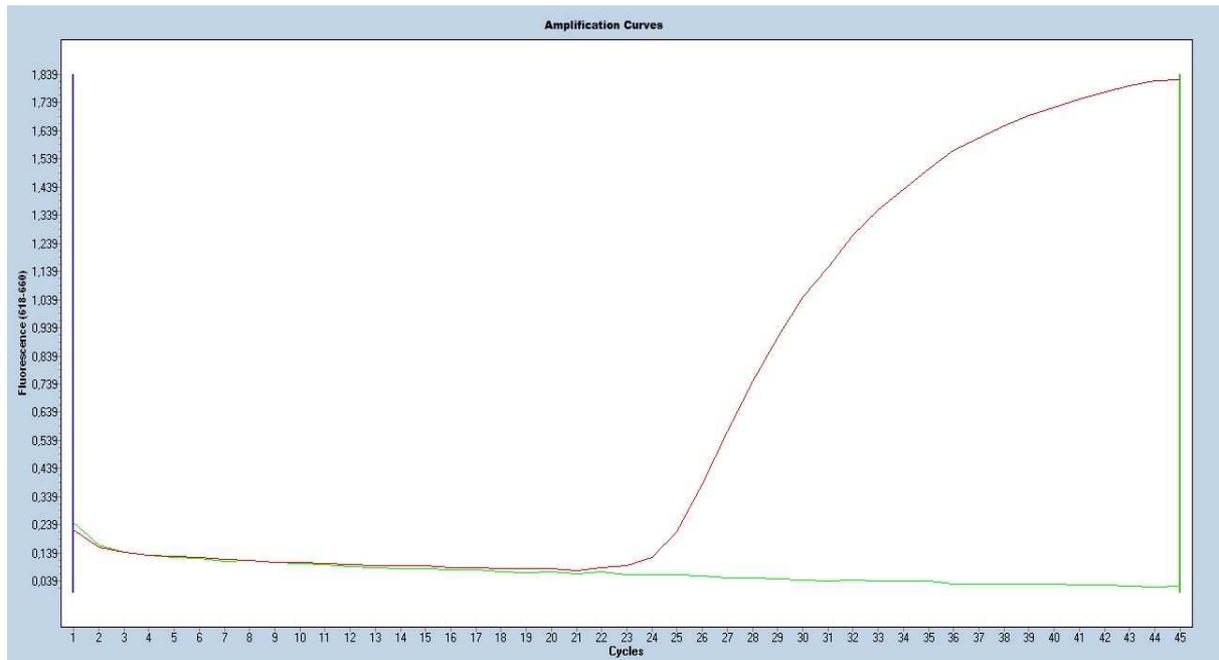


Figure 3: Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Campylobacter* spp.) sur le LightCycler® 480II

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 ≥ 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 μl chacune) avec le LightCycler® 480II.

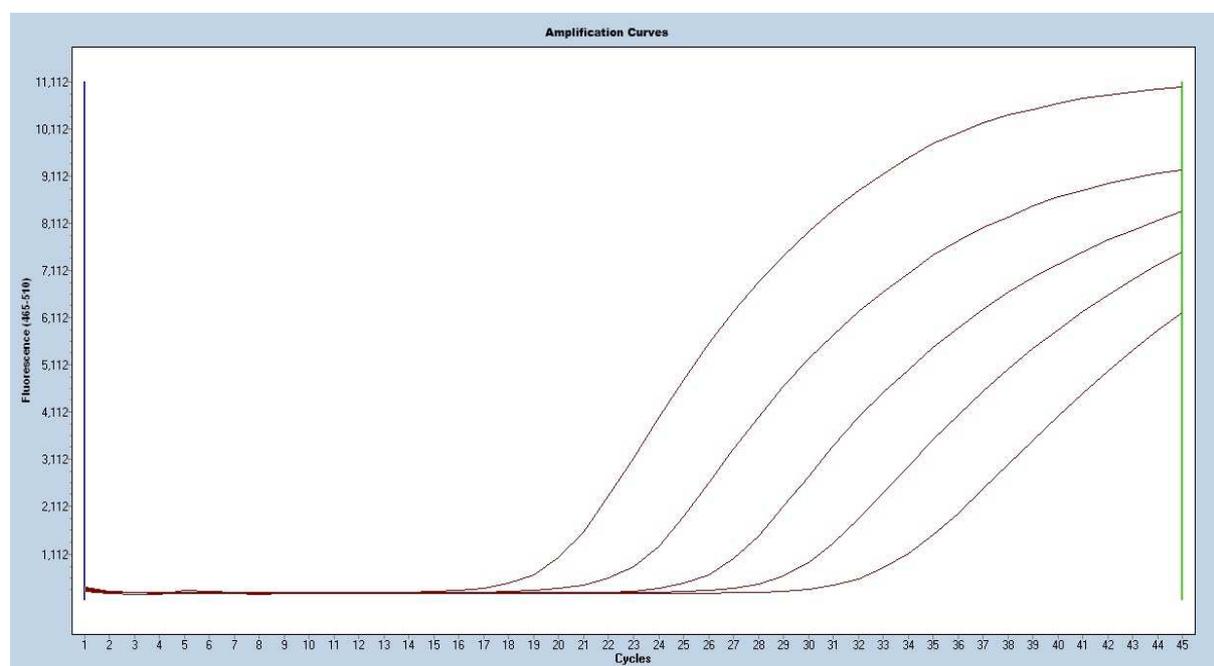


Figure 4: Série de dilutions pour *Salmonella* spp. ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

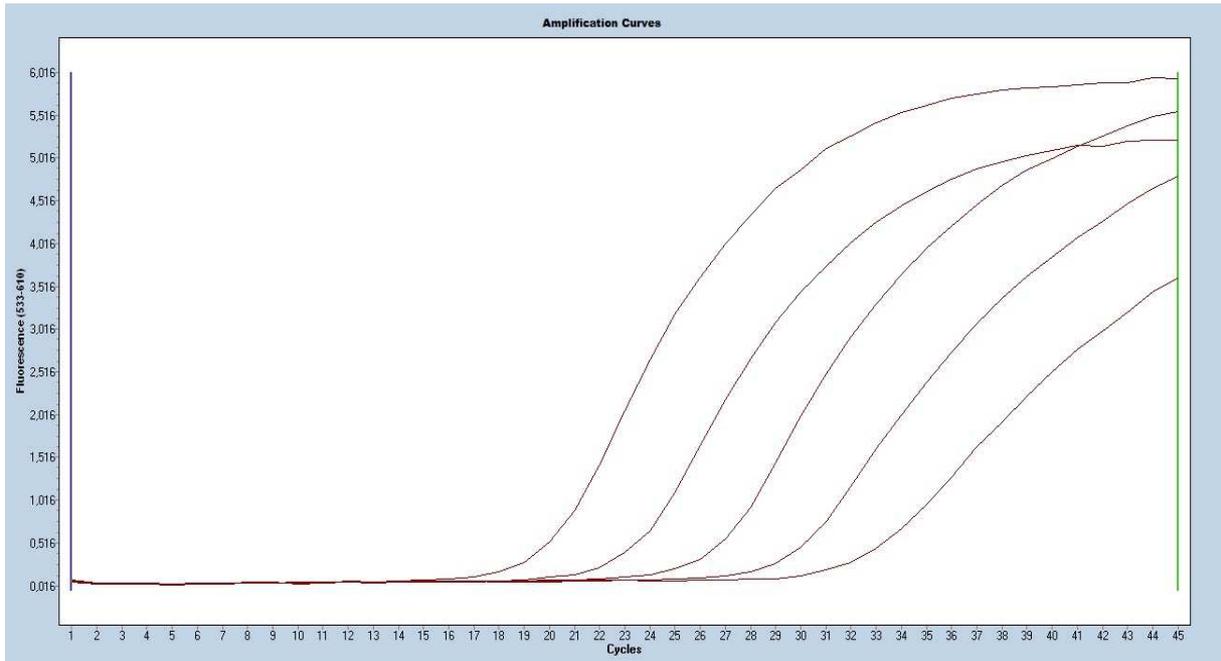


Figure 5: Série de dilutions pour *Yersinia enterocolitica* (*ystA*) ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

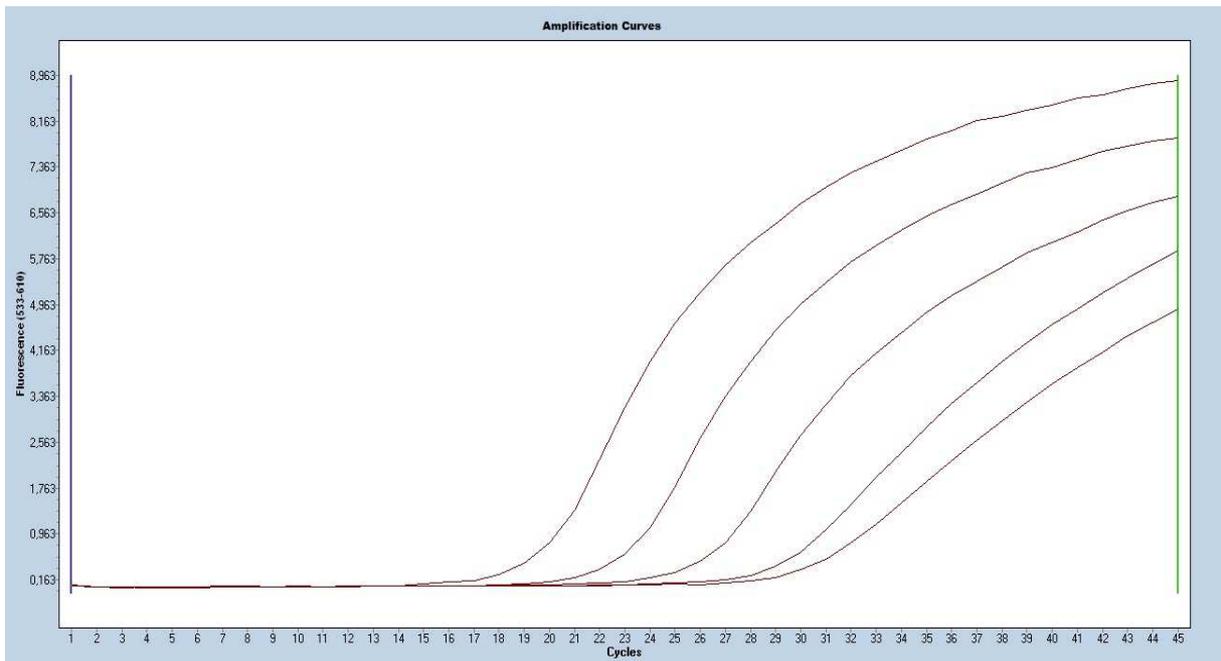


Figure 6: Série de dilutions pour *Yersinia enterocolitica* (*ystB*) ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

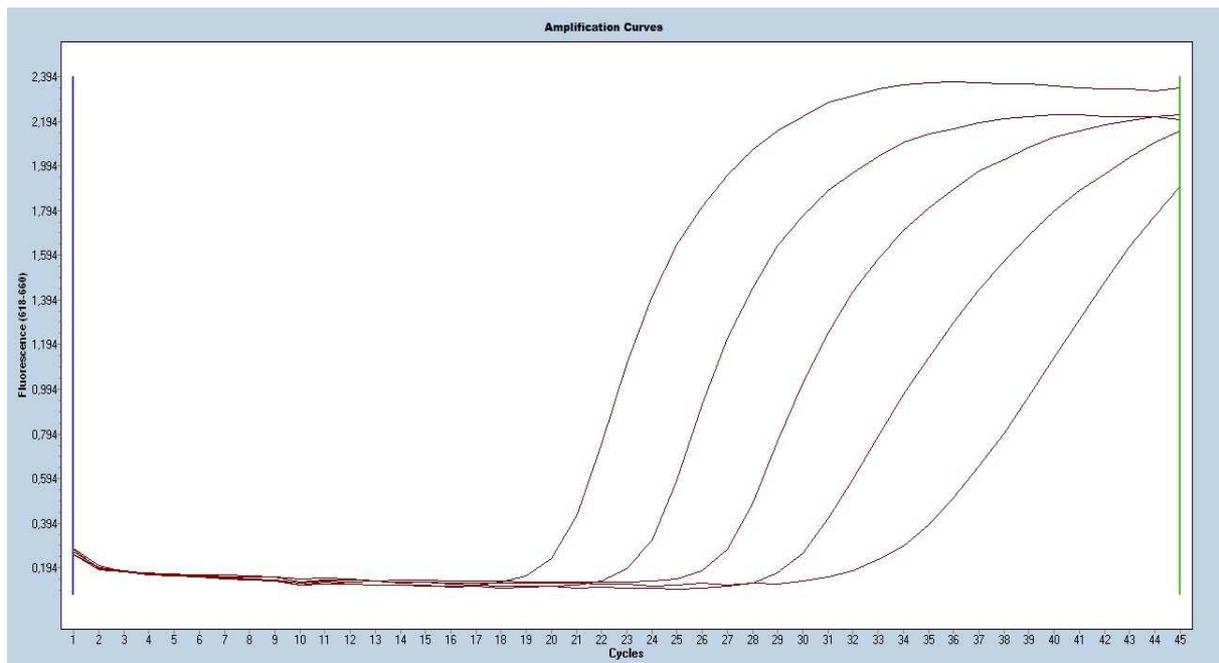


Figure 7: Série de dilutions pour *Campylobacter* spp. ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

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

Sérotypes de <i>Salmonella</i>					
<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>	+		
Espèces de <i>Yersinia</i>					
<i>Y. enterocolitica</i>	+	<i>Y enterocolitica</i> sous-esp. <i>palearctica</i>	+		
Sous- espèce <i>Campylobacter</i>					
<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.