

## RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I

**REF** PG2415



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de STEC, de *Salmonella* spp., de *Campylobacter* spp. et d'EIEC/*Shigella* spp. dans des échantillons de selles humaines.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I 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 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. Le CDC estime à plus de 1 800 le nombre de cas de fièvre typhoïde aux États-Unis. 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>.

L'une des six espèces de *E. coli* bien connus pour être pathogènes pour l'être humain est *E. coli* entéro-invasif (EIEC). Dans les pays en développement, mais aussi chez les voyageurs revenant de ces pays, les EIEC peuvent provoquer des infections de type shigellose, étant donné qu'ils sont étroitement voisins des *Shigella* spp du point de vue biochimique et génétique. La pathogénicité des EIEC et des *Shigella* spp dépend de la capacité plasmide dépendante à envahir les cellules épithéliales du colon et à les détruire.

La détection du gène ipaH (*invasion plasmid antigen H*) permet de différencier les EIEC/*Shigella* spp. des ETEC.

Les symptômes cliniques de la shigellose provoquée par EIEC se caractérisent par des crampes abdominales continues accompagnées d'une diarrhée aqueuse, parfois sanguinolente. Les sources d'infection sont principalement l'eau et les aliments contaminés, mais la transmission est aussi possible d'une personne à l'autre. Outre EIEC/*Shigella* spp., les *E. coli* entérohémorragiques jouent aussi un rôle important. Chaque année, environ 1 000 infections par EHEC sont signalées en Allemagne.

Les EHEC sont un sous-groupe des *E. coli* produisant des toxines de Shiga (STEC ou VTEC) et ont la capacité de produire deux cytotoxines, les vérotoxines 1 et 2. En raison de l'étroite ressemblance entre les vérotoxines et les shigatoxines de *Shigella dysenteriae*, les VTEC sont aussi dénommés STEC.

La méthode classique de diagnostic des infections gastro-intestinales d'origine bactérienne en laboratoire est la culture qui prend plusieurs jours.

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Bacterial Stool Panel I est une méthode alternative intéressante pour l'analyse d'échantillons de selles. Il s'est révélé hautement sensible et spécifique pour la détection simultanée des quatre bactéries les plus importantes qui occasionnent des diarrhées (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et EIEC/*Shigella* spp.).

### 3. Principe du test

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel I est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. et EIEC/*Shigella* spp. Après isolation de l'ADN survient l'amplification des fragments de gène spécifiques aux STEC (stx1/stx2), *Salmonella* spp. (ttr), *Campylobacter* spp. (ADNr 16S) et EIEC/*Shigella* spp. (ipaH) (si présents). Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Bacterial Stool Panel I 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 5 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit

affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).

- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

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

**Tableau 2** Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC (Promega)
Instrument de PCR en temps réel :	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P (avec filtre ATTO)

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

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

## 7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

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

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

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

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

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'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 kit de PCR en temps réel RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I 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. L'ADN de contrôle interne Internal Control DNA peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si 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'ajouter 20 µl de **Internal Control DNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control DNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon.

## 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. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle sans matrice dans chaque exécution du test.

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

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

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	<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>

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 **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** au mélange de contrôle sans matrice de la PCR.

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

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

**Remarque :** si le **Internal Control DNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control DNA** 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 4, 5, 6, 7).



## 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® 480II

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

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

**Tableau 6** : Profil de PCR en temps réel pour Mx3005P

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

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

### 9.3.2 Profil universel de PCR en temps réel

**Remarque : le profil universel de PCR en temps réel doit seulement être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel 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® 480II

<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 de température / vitesse de montée	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

<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 de température / vitesse de montée	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>Roche LightCycler® 480II</b>	STEC	440/488	<b>Le RIDA® GENE Color Compensation Le kit IV (PG0004) est nécessaire</b>
	<i>Salmonella</i> spp.	465/510	
	ICD	533/580	
	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	533/610	
	<i>Campylobacter</i> spp.	618/660	
<b>Agilent Techn. Mx3005P</b>	STEC	ATTO	<b>Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé</b>
	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	
	ICD	HEX	
	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	ROX	
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	

## 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, 3 et 4) afin de déterminer qu'une série est valide.

La concentration du Positive Control pour STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. et *Campylobacter* spp. est 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	Gène Ct cible
Positive control	Positif	S/O <sup>*1</sup>	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

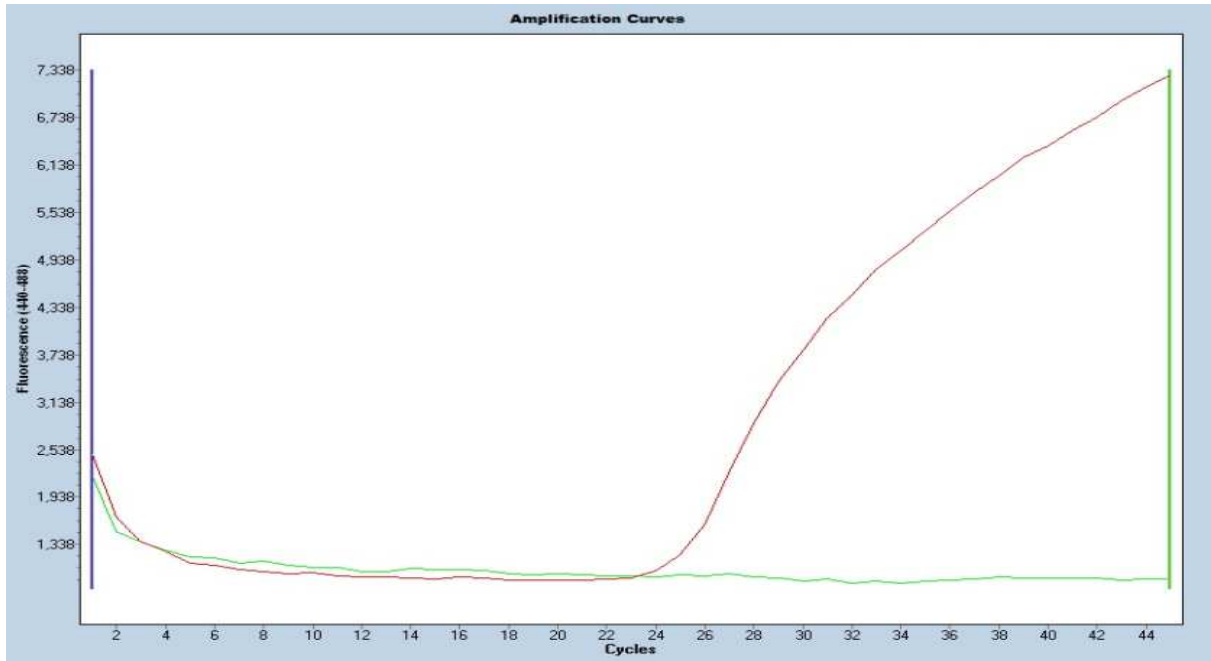
<sup>\*1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

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

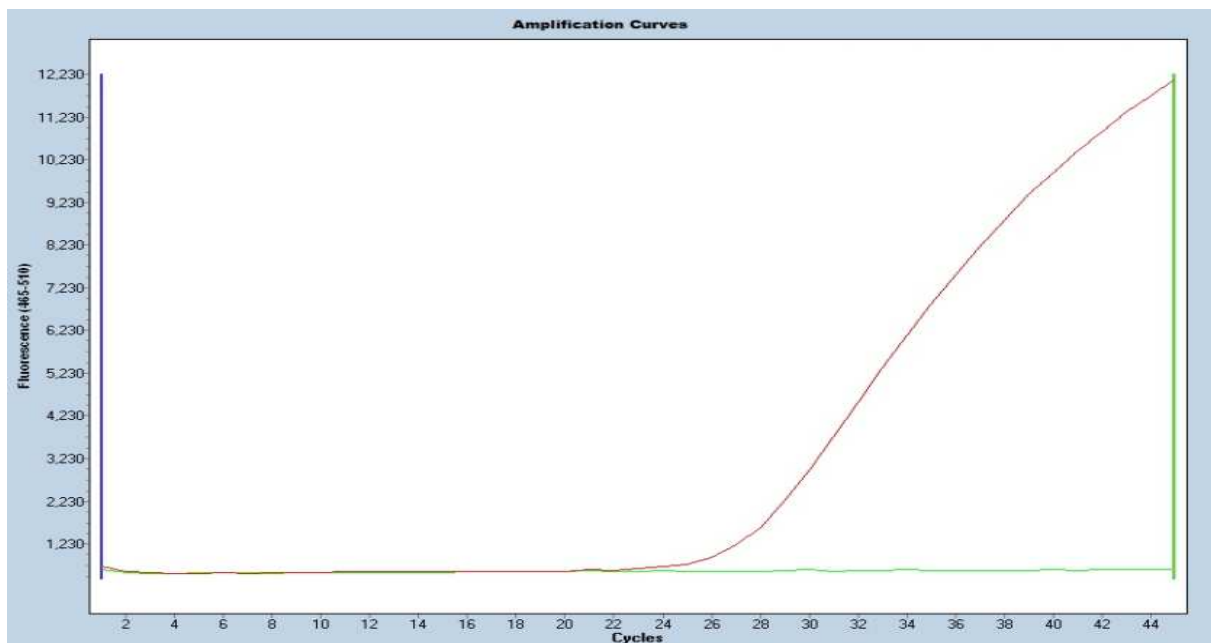
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

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

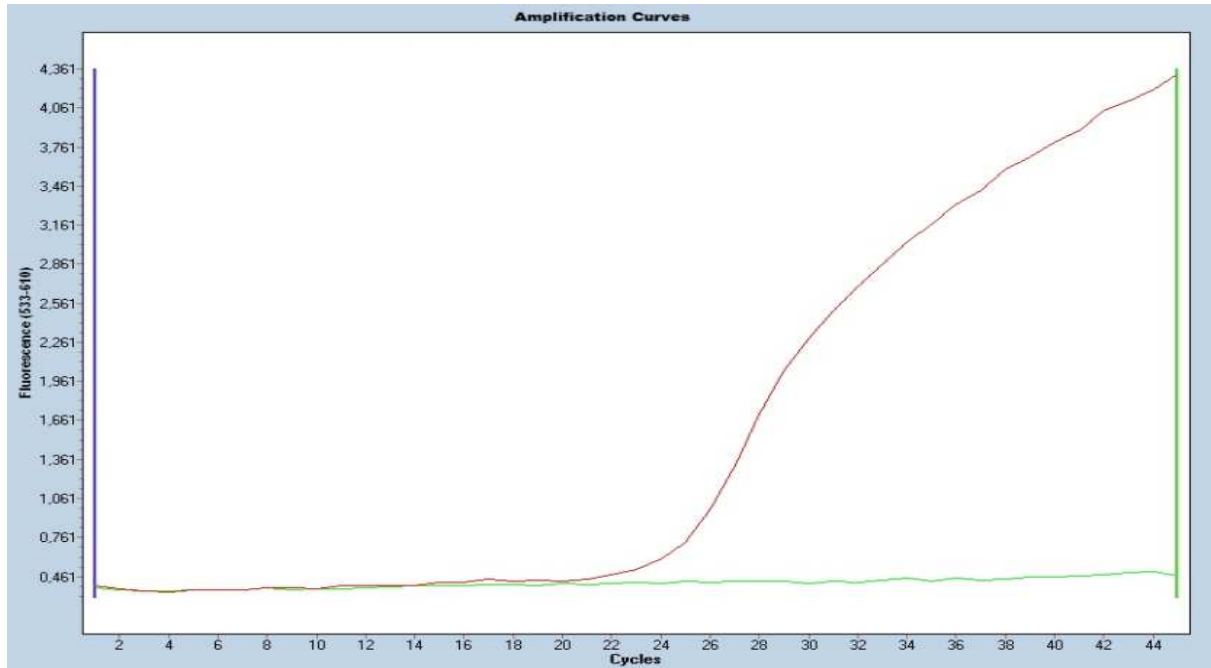
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



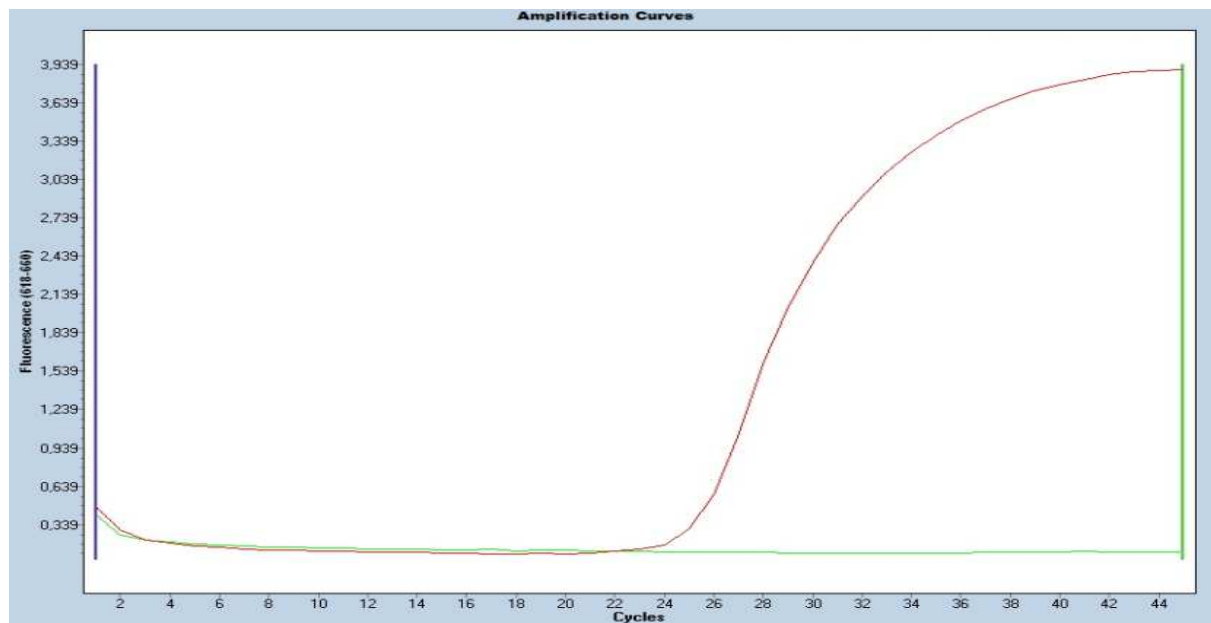
**Fig. 1 :** Exécution correcte des contrôles positif et sans matrice (STEC) sur le LightCycler® 480II



**Fig.2 :** Exécution correcte des contrôles positif et sans matrice (*Salmonella* spp.) sur le LightCycler® 480II



**Fig. 3 :** Exécution correcte des contrôles positif et sans matrice (*EIEC/Shigella spp.*) sur le LightCycler® 480II



**Fig. 4 :** Exécution correcte des contrôles positif et sans matrice (*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					
STEC	<i>Salmonella</i> spp.	EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	<i>Campylobacter</i> spp.	ICD	Résultat
positif	négatif	négatif	négatif	positif/négatif	STEC détectés
négatif	positif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp. détectées
négatif	négatif	positif	négatif	positif/négatif	EIEC/ <i>Shigella</i> spp. détectés
négatif	négatif	négatif	positif	positif/négatif	<i>Campylobacter</i> spp. détectés
positif	positif	négatif	négatif	positif/négatif	STEC, <i>Salmonella</i> spp. détectés
positif	négatif	positif	négatif	positif/négatif	STEC, EIEC/ <i>Shigella</i> spp. détectés
positif	négatif	négatif	positif	positif/négatif	STEC, <i>Campylobacter</i> spp. détectés
positif	positif	positif	négatif	positif/négatif	STEC, <i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp. détectés
positif	négatif	positif	positif	positif/négatif	STEC, EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. détectés
positif	positif	négatif	positif	positif/négatif	STEC, <i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. détectés
négatif	positif	positif	négatif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp. détectés
négatif	positif	négatif	positif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. détectés
négatif	positif	positif	positif	positif/négatif	<i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. détectés
négatif	négatif	positif	positif	positif/négatif	EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. détectés
positif	positif	positif	positif	positif/négatif	STEC, <i>Salmonella</i> spp., EIEC/ <i>Shigella</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

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

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

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

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



## 12. Limites de la méthode

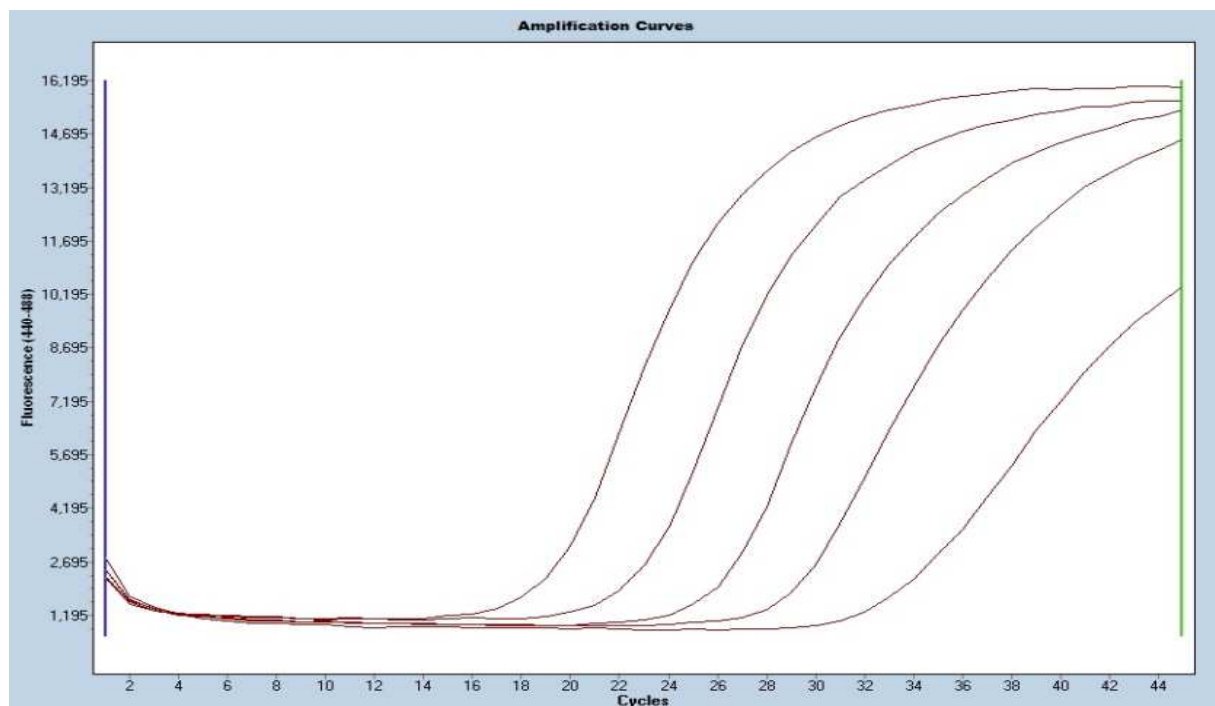
1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA<sup>®</sup> GENE Bacterial Stool Panel I.
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 (stx1/2, ttr, ADNr 16S, ipaH).

## 13. Performances

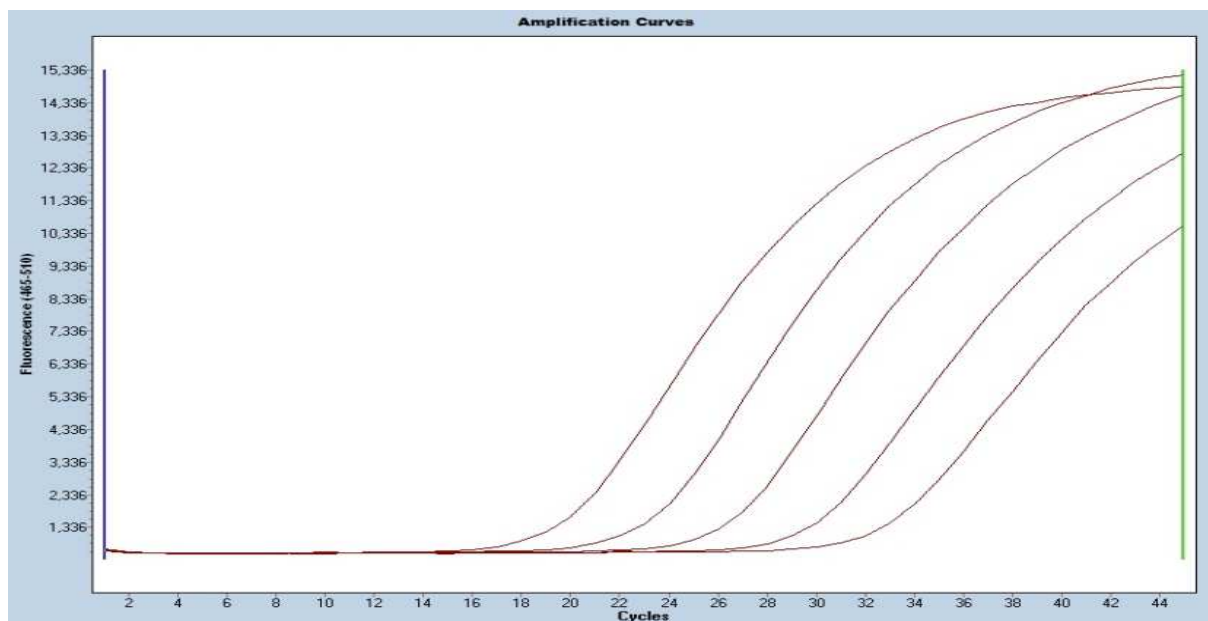
### 13.1 Sensibilité analytique

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

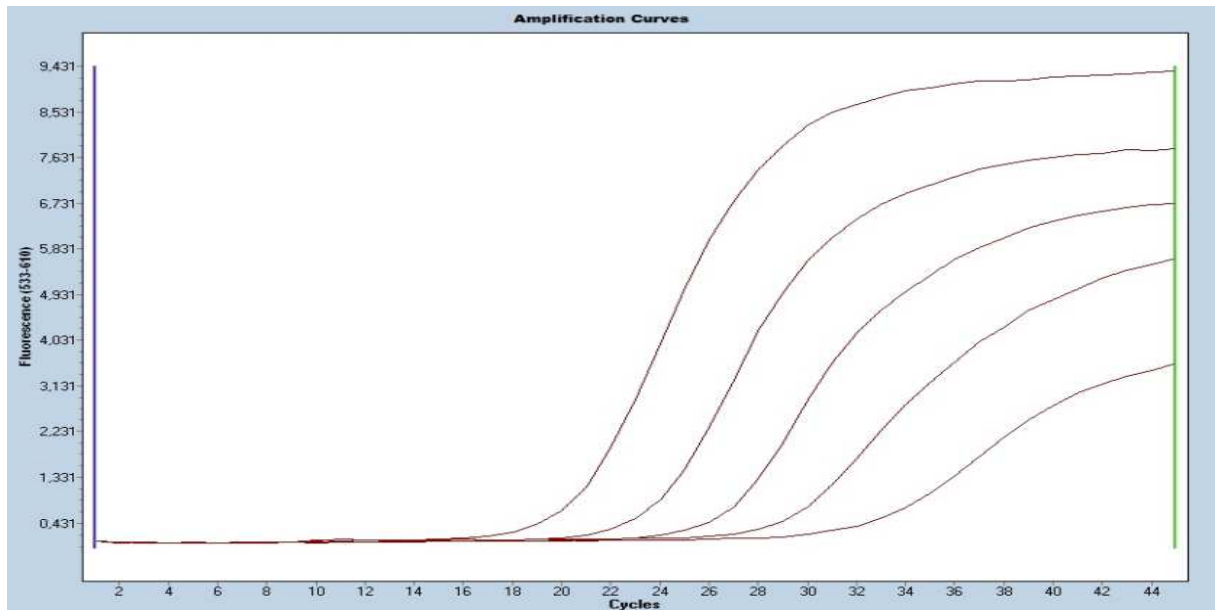
Les figures 5, 6, 7 et 8 suivantes montrent les séries de dilution de STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. et *Campylobacter* spp ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu$ l chacune) avec le LightCycler® 480II.



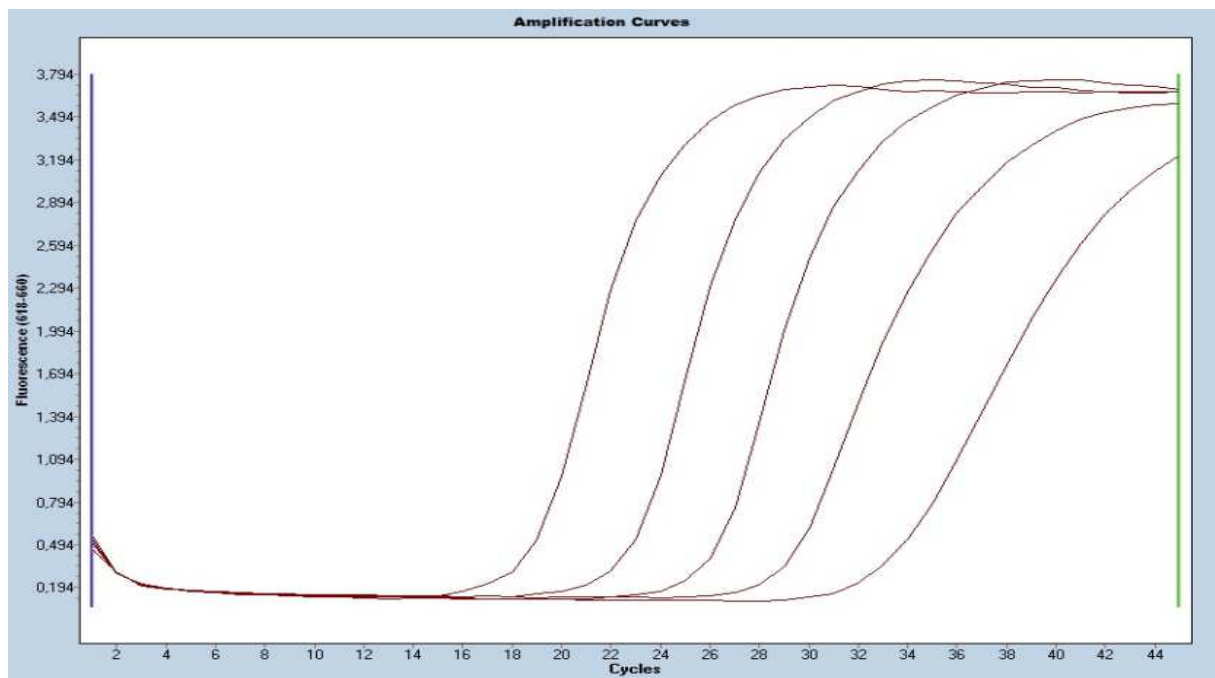
**Fig. 5 :** Série de dilutions pour STEC ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu$ l) avec le LightCycler® 480II



**Fig. 6 :** Série de dilutions pour *Salmonella* spp. ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig.7** : Série de dilutions pour EIEC/*Shigella* spp. ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu$ l) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Figure 8** : Série de dilutions pour *Campylobacter* spp. ( $10^5 - 10^1$  copies d'ADN par  $\mu$ l) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II

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

## 13.2 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I est spécifique pour STEC, *Salmonella* spp., EIEC/*Shigella* spp. et *Campylobacter* spp. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12) :

**Tableau 12** : Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG I	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	Norovirus GG II	-
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Rotavirus	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone 6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-						

### 13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I a été testée par rapport aux sous-types stx1/stx2, aux espèces de *Campylobacter*, aux sérotypes de *Salmonella* et aux EIEC/*Shigella* spp. (voir tableau 13). Tous les génogroupes de STEC, les espèces de *Campylobacter*, les sérotypes de *Salmonella* et les EIEC/*Shigella* spp. du panel ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Bacterial Stool Panel I.

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










<b>Sous-type stx1</b>					
stx1a	+	stx1c	+	stx1d	+
<b>Sous-type stx2</b>					
stx2a	+	stx2d	+	stx2g	+
stx2b	+	stx2e	+		
stx2c	+	stx2f	+		
<b>Espèces de <i>Campylobacter</i></b>					
<i>C. coli</i>	+	<i>C. jejuni</i>	+	<i>C. lari</i>	+
<b>Sérotypes de <i>Salmonella</i></b>					
<i>S. augustenbourg</i>	+	<i>S. ealing</i>	+	<i>S. muenchen</i>	+
<b><i>S. abony</i></b>	+	<i>S. enteritidis</i>	+	<i>S. newport</i>	+
<i>S. agona</i>	+	<i>S. essen</i>	+	<i>S. nottingham</i>	+
<i>S. amsterdam</i>	+	<i>S. glostrup</i>	+	<i>S. ohio</i>	+
<i>S. anatum</i>	+	<i>S. gloucester</i>	+	<i>S. oranienburg</i>	+
<i>S. arizonae</i>	+	<i>S. goldcoast</i>	+	<i>S. paratyphi A</i>	+
<b><i>S. bareilly</i></b>	+	<i>S. hadar</i>	+	<i>S. poona</i>	+
<i>S. berta</i>	+	<i>S. haifa</i>	+	<i>S. pullorum</i>	+
<i>S. blegdam</i>	+	<i>S. heidelberg</i>	+	<i>S. rostock</i>	+
<i>S. bongori</i>	+	<i>S. infantis</i>	+	<b><i>S. saintpaul</i></b>	+
<i>S. bovismorbificans</i>	+	<b><i>S. javiana</i></b>	+	<i>S. schwarzengrund</i>	+
<i>S. brandenburg</i>	+	<b><i>S. kedougou</i></b>	+	<i>S. senftenberg</i>	+
<i>S. caracas</i>	+	<i>S. kentucky</i>	+	<i>S. typhimurium</i>	+
<b><i>S. chloeraesius</i></b>	+	<i>S. kiel</i>	+	<i>S. virchow</i>	+
<i>S. derby</i>	+	<i>S. livingston</i>	+	<i>S. wernigerode</i>	+
<b><i>S. diarizonae</i></b>	+	<b><i>S. mississippi</i></b>	+	<i>S. wilhelmsburg</i>	+
<i>S. dublin</i>	+	<i>S. montevideo</i>	+	<b><i>S. worthington</i></b>	+
<i>S. duesseldorf</i>	+	<i>S. moscow</i>	+		
<b><i>Shigella</i></b>					
<i>S. boydii</i>	+	<i>S. dysenteriae</i>	+	<i>S. flexneri</i>	+
<i>S. sonnei</i>	+				

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2015-06-15	Version pour la publication
2018-06-06	Révision générale
2018-06-06	4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

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

### Symboles spécifiques au test

Sans objet



## 16. Bibliographie

1. 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 2012. Bad Bug Book 2nd Edition. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.
4. Ruiz-Palacios GM. 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. Clinical Infectious Diseases 2010; 50:882–889.
7. Pui CF et al. International Food Research Journal 2011; 18: 465-473.