

RIDA® GENE Bordetella

REF PG2505



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



1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE Bordetella est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella holmesii* dans des frottis et des lavages nasopharyngiens humains. Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Bordetella est destiné à faciliter le diagnostic de la coqueluche à *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella holmesii*, respectivement.

2. Résumé et explication du test

Bordetella pertussis est une bactérie gram-négative qui provoque une infection respiratoire aiguë appelée coqueluche. *Bordetella holmesii*, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella bronchiseptica* provoquent des maladies de type coqueluche moins courantes qui sont généralement moins sévères. La coqueluche peut devenir une maladie grave chez les personnes de tout âge, qui peut engager le pronostic vital en particulier chez les nourrissons. L'OMS (Organisation mondiale de la Santé) estime à 16 millions le nombre de cas de coqueluche dans le monde entier en 2008, responsables d'environ 195 000 décès d'enfants¹. En 2012, 41 800 cas de coqueluche ont été signalés aux États-Unis². On estime à entre 3 et 35 % le nombre d'infections à *Bordetella* provoquées par *B. parapertussis*^{3,4}. Dans une étude sur 3 ans, *B. parapertussis* a été identifié dans 14 % des échantillons de malades de coqueluche aux États-Unis⁵. Dans une étude française, *B. holmesii* a été détecté dans environ 20 % des infections à *Bordetella* chez les adolescents et les adultes⁶. Une infection à *Bordetella* se transmet par voie respiratoire par l'intermédiaire de gouttelettes en suspension dans l'air. Après une période d'incubation de 7 à 10 jours, l'évolution clinique de la maladie se poursuit en trois étapes : stade catarrhal (1 à 2 semaines) avec des symptômes de rhume, le stade paroxysmal (1 à 2 semaines) caractérisé par des paroxysmes de secousses expiratoires nombreuses et rapides suivies de vomissements et le stade de convalescence (6 à 10 semaines) caractérisé par la disparition des secousses expiratoires paroxystiques^{7,8}. Dans les populations à forte couverture vaccinale des nourrissons et des enfants, la transmission de la coqueluche se fait quand même, car la protection conférée par la vaccination et après une infection naturelle se dissipe après 10 à 15 ans. De ce fait, dans les populations bien vaccinées, la maladie est transmise des adolescents et des adultes vers les nourrissons ou d'une personne dépourvue de protection vaccinale à l'autre^{8,9}. Une étude récente évoque un manque de protection croisée contre *B. holmesii* après une vaccination contre la coqueluche¹⁰. Plusieurs méthodes de laboratoire, notamment la mise en culture, la sérologie et la PCR sont disponibles pour le diagnostic de la coqueluche. La spécificité de la culture est quasiment de 100 % et peut atteindre 50 % au cours des 2 premières semaines après l'apparition de la toux, puis décroît au fil du temps. La mise en culture nécessite des milieux spéciaux et dure environ une semaine. Le diagnostic de la coqueluche par sérologie n'est pas opportun dans les premiers stades de la maladie.

Des anticorps peuvent être détectés au plus tôt deux semaines après une infection ou une vaccination. On peut utiliser le test ELISA avec la toxine de la coqueluche (TC) ou l'hémagglutinine filamenteuse comme antigène de test. L'hémagglutinine filamenteuse est produite par toutes les espèces de *Bordetella*, tandis que la TC est uniquement produite par *B. pertussis*. La TC est présente dans tous les vaccins, alors que l'hémagglutinine filamenteuse est une composante de nombreux vaccins acellulaires contre la coqueluche. Un dosage sérologique ne permet pas de faire la distinction entre les réponses immunitaires et la vaccination. La PCR en temps réel permet une détection rapide, sensible et spécifique au cours des 4 premières semaines suivant l'apparition de la toux.

En outre, la PCR en temps réel permet de différencier les espèces pathogènes de *Bordetella*^{8,9}.

3. Principe du test

Le test RIDA[®] GENE Bordetella est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* et *Bordetella holmesii* (IS481, IS1001) dans des frottis et des lavages nasopharyngiens humains.

Après isolement de l'ADN, on procède à l'amplification des fragments de gène (si présents) spécifiques à *Bordetella pertussis* (IS481), *Bordetella parapertussis* (pIS1001) et *Bordetella holmesii* (IS481, hIS1001). Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®] GENE Bordetella contient un Internal Control DNA (ICD) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

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

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

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel RIDA[®] GENE Bordetella 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 [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Instrument de PCR en temps réel :	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

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

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

- Écouvillons floqués secs en nylon stériles (par ex., Copan Diagnostic Inc., référence 552C)
- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler[®] 480II et 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 sans poudre
- Eau de PCR (sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

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

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

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

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

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon à partir de frottis nasopharyngiens

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

Pour isoler l'ADN des frottis nasopharyngiens, il est recommandé de suivre la procédure suivante : Ajouter 400 µl d'eau de PCR dans un tube de préparation. Insérer l'écouvillon dans l'eau et couper ou casser la tige de l'écouvillon. Fermer hermétiquement le tube de préparation et continuer conformément aux instructions du fabricant du kit ou du système d'extraction de l'ADN.

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

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

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

8.2 Préparation de l'échantillon à partir de lavages nasopharyngiens

Pour isoler l'ADN des lavages nasopharyngiens, ajouter le volume adéquat conformément aux instructions du fabricant du kit ou du système d'extraction de l'ADN.

Pour isoler l'ADN des écouvillons secs, 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.

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

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

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

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif 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 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 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 **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 négatif pour la PCR.

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

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

Remarque : si le **Internal Control DNA** est utilisé 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 5, 6, 7, 8).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil de PCR en temps réel de l'ADN

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

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

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

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

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

<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, ABI7500, 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 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
Roche LightCycler® 480II	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	533/580	
	<i>B. holmesii</i>	533/610	
	<i>B. parapertussis</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	465/510	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICD	540/580	
	<i>B. holmesii</i>	540/610	
	<i>B. parapertussis</i>	610/670	
ABI 7500	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICD	HEX	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	FAM	-
	ICD	VIC	
	<i>B. holmesii</i>	ROX	
	<i>B. parapertussis</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	<i>B. pertussis/B. holmesii</i>	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut
	ICD	Jaune	
	<i>B. holmesii</i>	Orange	
	<i>B. parapertussis</i>	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 négatif et le contrôle positif doivent obtenir des résultats corrects (voir tableau 10, figures 1, 2 et 3) pour que l'exécution soit déclarée valide.

Le **Positive Control** *B. pertussis*, *B. holmesii* et *B. parapertussis* a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

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

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Gène Ct cible
Positive control	Positif	S/O * ¹	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

*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 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

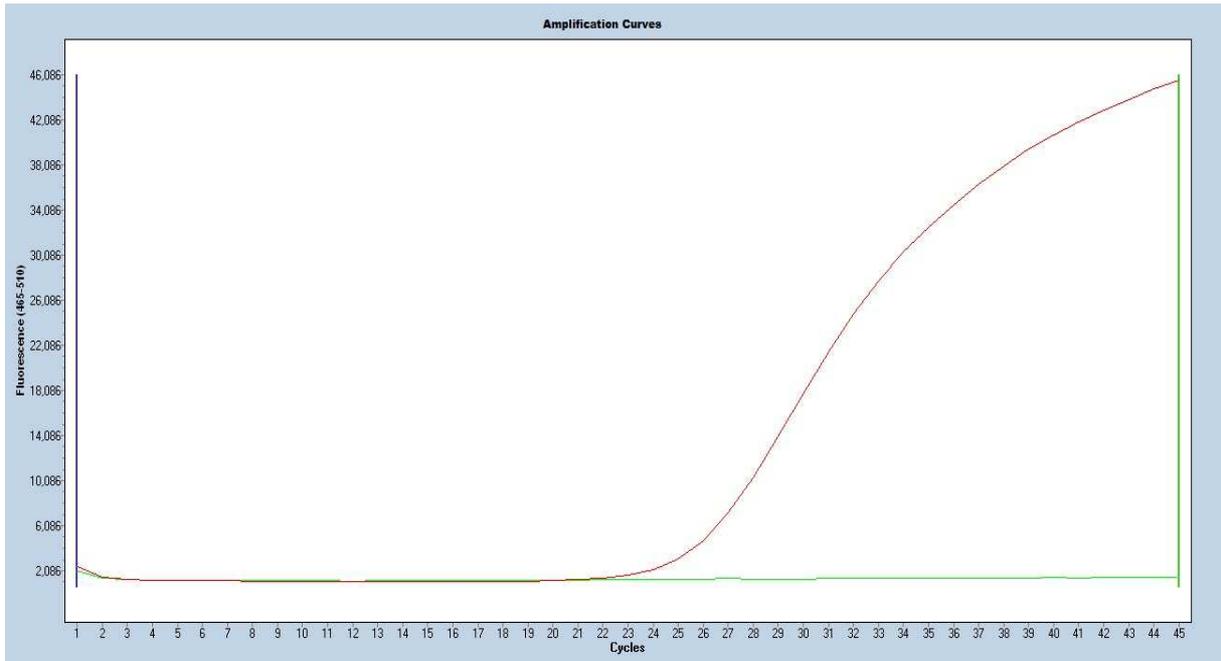


Fig. 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Bordetella pertussis*) sur le LightCycler® 480II

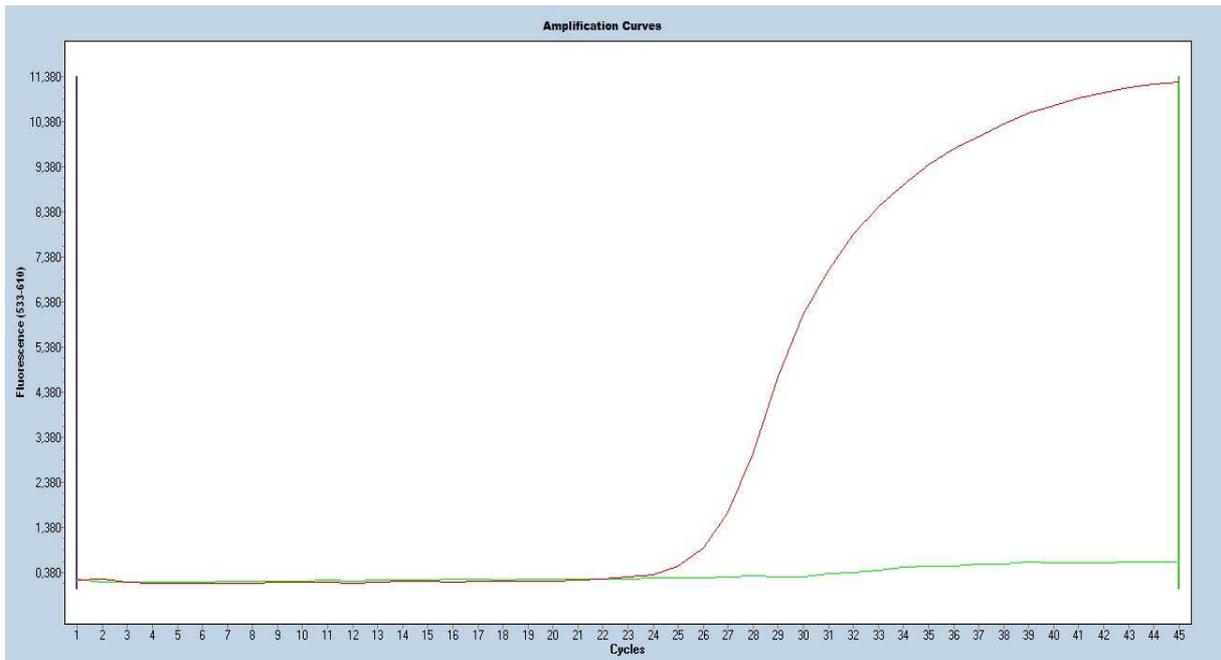


Fig. 2 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Bordetella holmesii*) sur le LightCycler® 480II

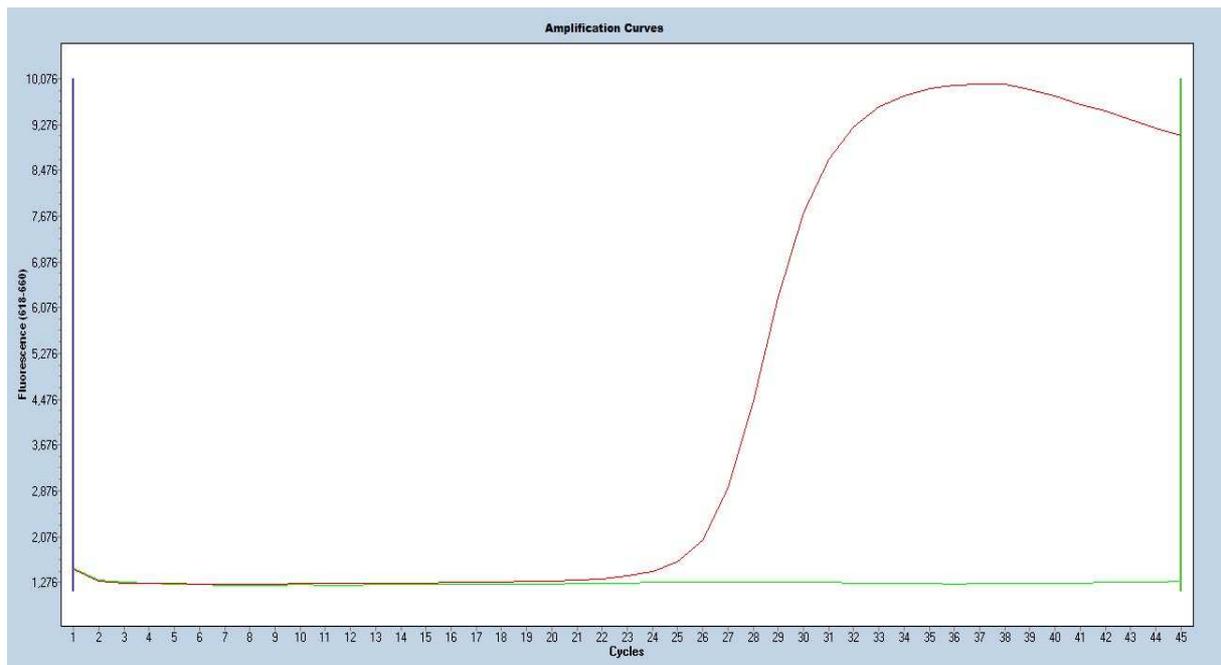


Fig. 3 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (*Bordetella parapertussis*) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

Tableau 11 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles			ICD	Résultat
<i>B. pertussis</i> / <i>B. holmesii</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>B. parapertussis</i>		
positif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>B. pertussis</i> détecté
positif	positif	négatif	positif/négatif	<i>B. holmesii</i> détecté*
négatif	négatif	positif	positif/négatif	<i>B. parapertussis</i> détecté
négatif	positif	négatif	positif/négatif	Non valide
négatif	positif	positif	positif/négatif	Non valide
positif	négatif	positif	positif/négatif	<i>B. pertussis</i> et <i>B. parapertussis</i> détecté
positif	positif	positif	positif/négatif	<i>B. holmesii</i> et <i>B. parapertussis</i> détecté
négatif	négatif	négatif	positif	Les gènes cibles ne sont pas détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

Remarque: *voir également le point 8 du chapitre 12 : Limites de la méthode

B. pertussis, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* est détecté si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control DNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

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

B. pertussis, *B. parapertussis* ou *B. holmesii* n'est pas détecté si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le Internal Control DNA. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ADN du contrôle Internal Control DNA.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et l'ADN du contrôle interne Internal Control DNA ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. 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 frottis et les lavages nasopharyngiens humains.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA® GENE Bordetella.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible pour *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii*, respectivement (IS481, IS1001).
8. En cas de résultat positif pour *B. pertussis* et *B. holmesii*, il n'est pas possible d'exclure une co-infection en raison des gènes cibles détectés.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Bordetella est ≥ 10 copies d'ADN par réaction pour *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii*, respectivement.

Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent les séries de dilution de *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. holmesii* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl chacune) avec le LightCycler® 480II.

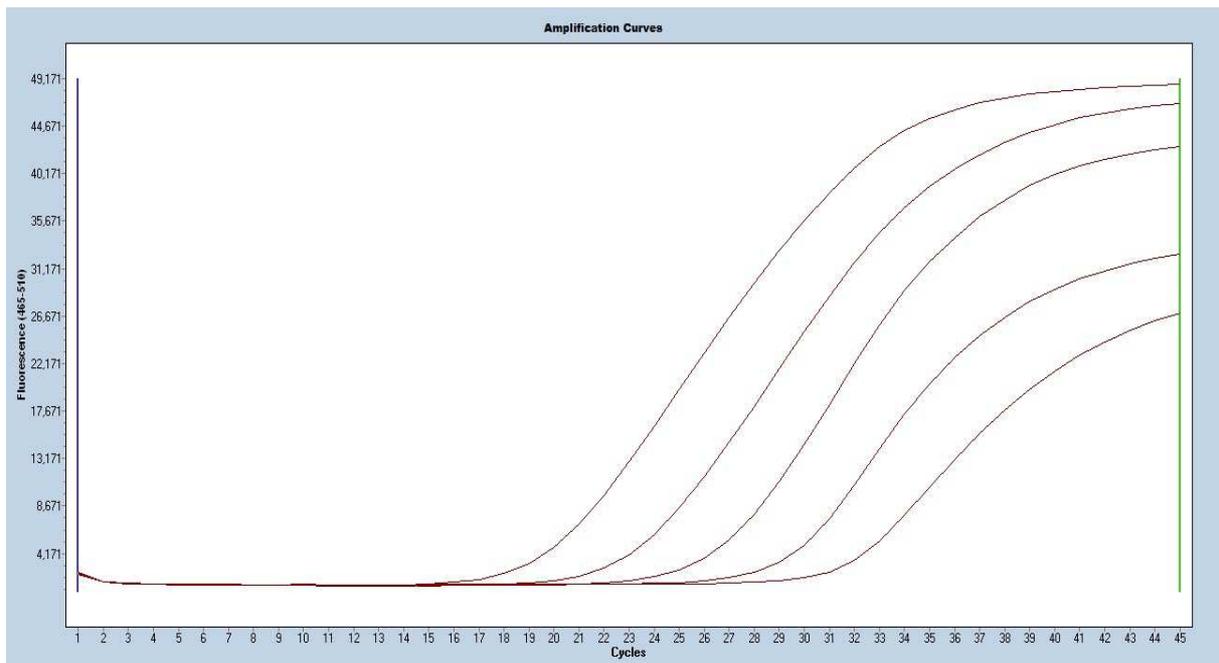


Fig. 4 : Série de dilutions de *Bordetella pertussis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler® 480II

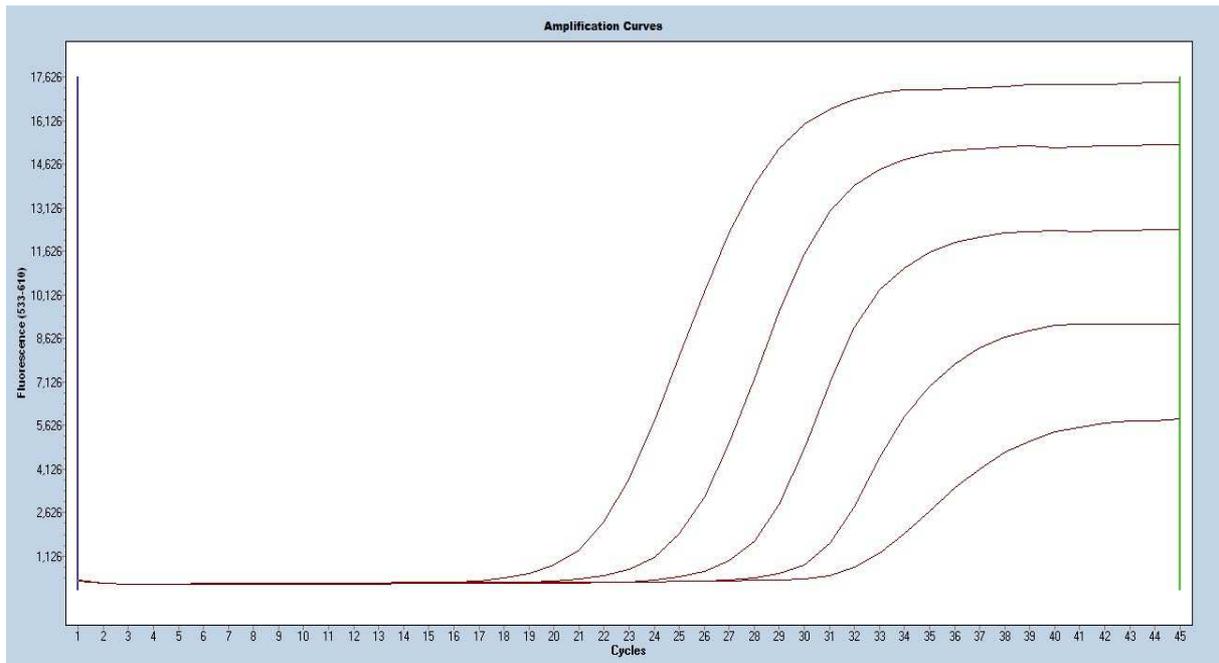


Fig. 5 : Série de dilutions de *Bordetella holmesii* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

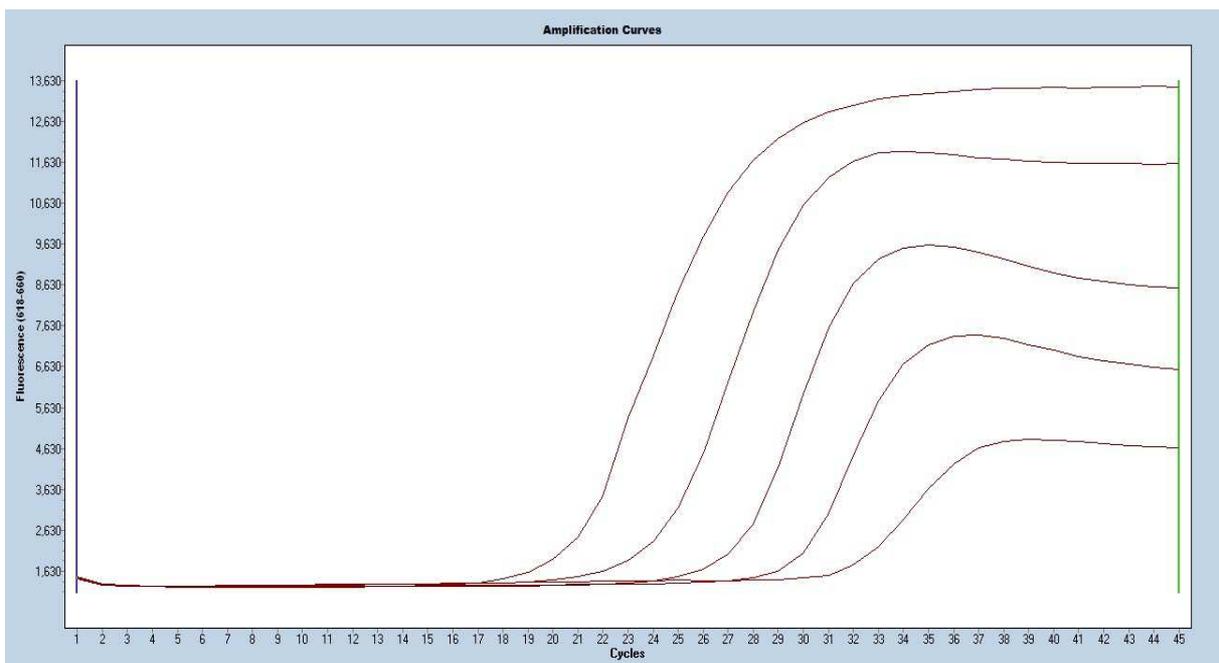


Fig. 6 : Série de dilutions de *Bordetella parapertussis* ($10^5 - 10^1$ copies d'ADN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

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.

13.2 Spécificité analytique

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Bordetella est spécifique pour *Bordetella pertussis*, *Bordetella holmesii* et *Bordetella parapertussis* dans des frottis et des lavages nasopharyngiens humains. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12) :

Tableau 12 : Test de la réactivité croisée

<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Virus Coxsackie B4, humain	-	Virus parainfluenza, sérotype 3	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Cytomégalovirus, humain	-	Virus parainfluenza 4b souche CH19503, humain	-
Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche Long	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	Virus respiratoire syncytial, humain, souche 9320	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Rhinovirus, humain, génogroupe A	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	Virus d'Epstein-Barr souche B95-8	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	Virus Herpes simplex 1 souche McIntyre	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i>	-	Virus Herpes simplex 2 souche MS	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter lari</i>	-	Virus de la grippe A/PR/8/34	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> souche MGH78578	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	-	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> R22	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> souche FH d'Eaton Agent	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> souche NCTC 7465	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Metapneumovirus</i> , humain	-	Virus varicelle-zona (type B)	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Neisseria meningitides</i> , souche FAM18	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	Virus parainfluenza 1 souche C35, humain	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Coronavirus 229E, humain	-	Virus parainfluenza 2 souche Greer, humain	-		

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-05-17	3. Principe du test 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9.4 Configuration du canal de détection 11. Interprétation des résultats 13. Spécificité analytique

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 Health Organization 2011. Pertussis. <http://www.who.int/immunization/topics/pertussis/en/index.html>. Accessed 21.05.2013.
2. Centers for Disease Control and Prevention 2013. 2012 Provisional Pertussis Surveillance Report. <http://www.cdc.gov/pertussis/downloads/Provisional-Pertussis-Surveillance-Report.pdf>. Accessed 21.05.2013.
3. Linneman CC und Perry EB. *Bordetella parapertussis*. Recent experience and a review of the literature. Am J Dis Child. 1977, 131 (5): 560-563.
4. Mertsola, J. Mixed outbreak of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* infection in Finland. Eur J Clin Microbiol. 1985, 4(2): 123-128.
5. Cherry JD und Seaton BL. Patterns of *Bordetella parapertussis* Respiratory Illnesses: 2008–2010.
6. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in Nasopharyngeal Samples from French Patients with Suspected Pertussis. Njamkepo E et al. Significant Finding of *Bordetella holmesii* DNA in J. Clin Microbiol 2011, 49(12):4347-4348.
7. Robert Koch Institut 2013. Pertussis (Keuchhusten). RKI-Ratgeber für Ärzte 2010. Accessed 21.05.2013.
8. Centers for Disease Control and Prevention 2012. Pertussis. Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. The Pink Book: Course Textbook - 12th Edition Second Printing (May 2012). Accessed 21.05.2013.
9. Riffelmann M et al. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. J Clin Microbio. 2005, 43(10): 4925-4929.
10. Zhang X et al. Lack of Cross-protection against *Bordetella holmesii* after Pertussis Vaccination. Emerg Infect Dis 2012, 18(11): 1771-1779.