

## RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I

**REF** PG1715



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE Parasitic Stool Panel I est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* et *Dientamoeba fragilis* dans des échantillons de selles humaines.

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

## 2. Résumé et explication du test

*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* et *Dientamoeba fragilis* sont les principaux protozoaires à l'origine de diarrhées.

*Giardia lamblia* (synonyme *G. intestinalis* ou *G. duodenales*) figure parmi les causes de diarrhée les plus importantes. Selon le CDC (Center for Disease Control) environ 2 % de la population adulte et 6 à 8 % de la population infantile dans les pays développés et environ un tiers de la population totale dans les pays en développement sont atteints de giardiase<sup>1</sup>. Selon les estimations du CDC, il y a environ 77 000 cas de giardiase par an aux États-Unis<sup>2</sup>. L'infection par *G. lamblia* survient après l'ingestion de kystes dans de l'eau de boisson ou des aliments contaminés ou par voie oro-fécale d'une personne à l'autre. La durée d'incubation est de 1 à 3 semaines. Les symptômes de la giardiase (lambliaose) sont une diarrhée aiguë ou chronique, mais une élimination des kystes asymptomatiques se produit également. Les symptômes aigus sont notamment : diarrhée liquide, perte d'appétit, nausées, crampes abdominales et perte de poids<sup>1</sup>.

*Cryptosporidium parvum* est l'une des différentes espèces du genre *Cryptosporidium*. Mis à part *C. parvum*, *C. hominis* provoque aussi couramment la cryptosporidiose chez l'homme<sup>4</sup>. Cependant, des infections par d'autres espèces de *Cryptosporidium* telles que *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* et *C. muris* peuvent donner lieu à des symptômes cliniques<sup>3</sup>. La cryptosporidiose a été détectée chez jusqu'à 0,2 % de personnes saines et environ 2 % de patients atteints de diarrhée dans les pays développés. Dans les pays en développement, la prévalence augmentait jusqu'à 9 %. Chez les patients atteints de VIH souffrant de diarrhée, des espèces de *Cryptosporidium* ont été détectées à hauteur de 14 à 24 % d'entre eux et jusqu'à 5 % des patients atteints de VIH asymptomatique étaient infectés<sup>5,6</sup>. Lors d'une épidémie survenue en 1993 à Milwaukee (Wisconsin, États-Unis), plus de 400 000 personnes ont été atteints<sup>4</sup>. Chaque année, on estime à 748 000 le nombre de cas de cryptosporidiose aux États-Unis<sup>7</sup>. L'infection survient après l'ingestion d'ookystes dans de l'eau ou des aliments contaminés, mais aussi par la voie oro-fécale d'une personne à l'autre. Chez les sujets immunocompétents, la maladie se manifeste 2 à 10 jours après sous la forme de diarrhée liquide spontanément résolutive qui peut s'accompagner de nausées, de douleurs abdominales et d'une perte de poids. Les sujets immunodéprimés développent souvent une maladie grave, chronique et parfois fatale<sup>2,4</sup>.

*Entamoeba histolytica* est la seule espèce pathogène pour l'homme du genre *Entamoeba* et provoque l'amibiase. Une infection par *E. histolytica* se produit par ingestion de kystes dans de l'eau de boisson ou des aliments contaminés ou par voie oro-fécale d'une personne à l'autre. La plupart des infections par *E. histolytica* se manifestent sous la forme d'une colonisation asymptomatique. Dans 10 % des cas, l'infection entraîne une colite amibienne et dans de rares cas une amibiase extra-intestinale, principalement dans le foie (abcès amibien du foie). Les symptômes cliniques associés à une amibiase intestinale sont des douleurs abdominales et des diarrhées sévères avec présence de sang et de glaires dans les selles. L'OMS estime qu'environ 50 millions de personnes dans le monde sont atteintes d'amibiase chaque année, avec 100 000 décès par an<sup>2,8</sup>.

*Dientamoeba fragilis* est présent partout dans le monde et de récentes études ont démontré son potentiel pathogène et l'ont impliqué comme une cause principale de maladie gastro-intestinale. Les infections par *D. fragilis* peuvent être symptomatiques ou asymptomatiques. Les symptômes de la dientamoebiose sont des douleurs abdominales et des diarrhées. La prévalence de *D. fragilis* varie de 0,3 à 52 % et dépasse souvent celle de *Giardia lamblia*<sup>9,10</sup>.

Généralement, la détection des parasites *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. et *Dientamoeba fragilis* se fait par examen microscopique d'échantillons fécaux, ce qui nécessite un personnel compétent. Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I est une nouvelle méthode alternative intéressante pour l'analyse d'échantillons de selles. Il s'est révélé hautement sensible et spécifique pour la détection simultanée des trois principaux parasites occasionnant des diarrhées (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* et *Dientamoeba fragilis*).

### 3. Principe du test

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic Stool Panel I est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* et *Dientamoeba fragilis* dans des échantillons de selles humaines.

Après isolation de l'ADN survient l'amplification des fragments de gène (ITS1-18S, si présent) spécifiques à *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* et *Dientamoeba fragilis*. Les cibles amplifiées pour *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* et *Dientamoeba fragilis* 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 Parasitic 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 15 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE Parasitic 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
Instrument de PCR en temps réel :	
Roche	LightCycler <sup>®</sup> 480II
Agilent Technologies	Mx3005P

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 le 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 non poudrés
- 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](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<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ADN (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ADN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3. Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I inclut un Internal Control DNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante.

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. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de Internal Control DNA au mélange de contrôle négatif et de 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 les réactifs [Reaction Mix], [Taq-Polymerase], [Positive Control], [No Template Control] et [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
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

**Tableau 4 :** Exemple de calcul et 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 à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle négatif pour la PCR.

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

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

**Remarque :** si le **Internal Control DNA** est utilisé à la fois comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange de contrôle positif pour la PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger brièvement 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 le 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/ 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 de l'ADN 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/ 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 RIDA® GENE DNA et ARN sont effectués lors d'une même exécution.

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

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition/ Vitesse de montée de température/	Maximale

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

## 9.4 Configuration du canal de détection

**Tableau 9** : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 480II	<i>Dientamoeba fragilis</i>	440/488	Le RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	<i>Giardia lamblia</i>	465/510	
	ICD	533/580	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	533/610	
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	<i>Dientamoeba fragilis</i>	ATTO	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé Les « paramètres de gain du jeu de filtres » pour ATTO doivent être réglés sur 8
	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	
	ICD	HEX	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	
	<i>Cryptosporidium</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.

Le **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies de contrôle positif, respectivement.

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

Échantillon	Résultat du test	Ct ICD	Ct cible
Contrôle positif	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Contrôle négatif	Négatif	Ct > 20	0

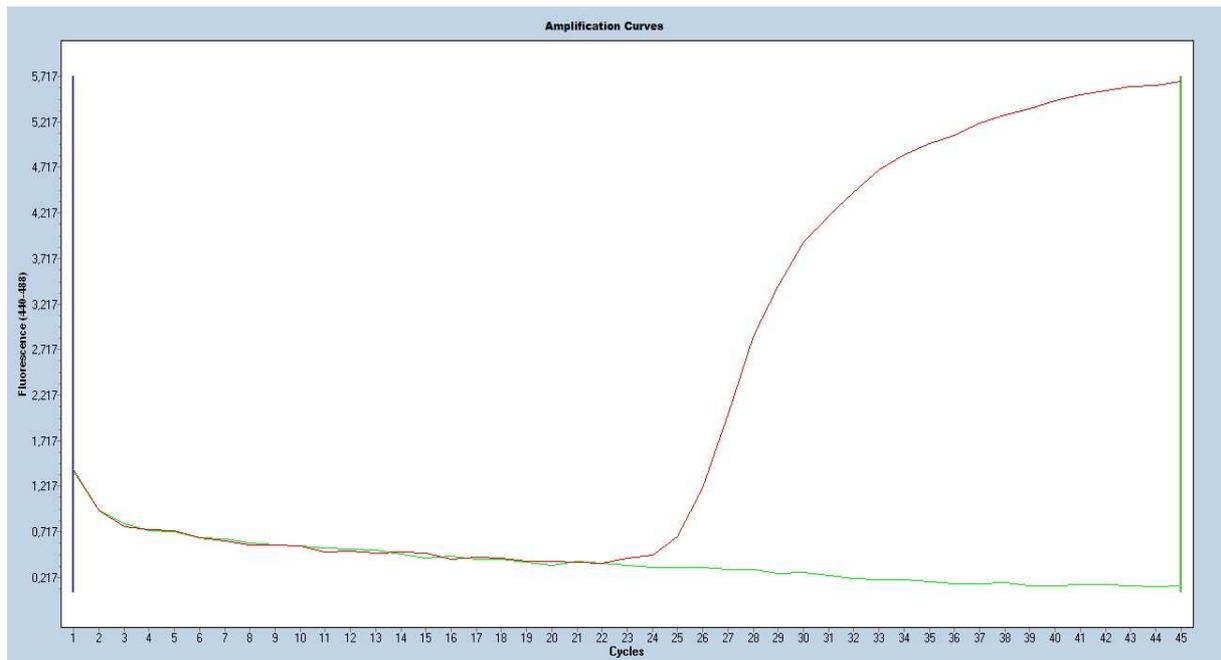
\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICD soit positif pour le contrôle positif.

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.

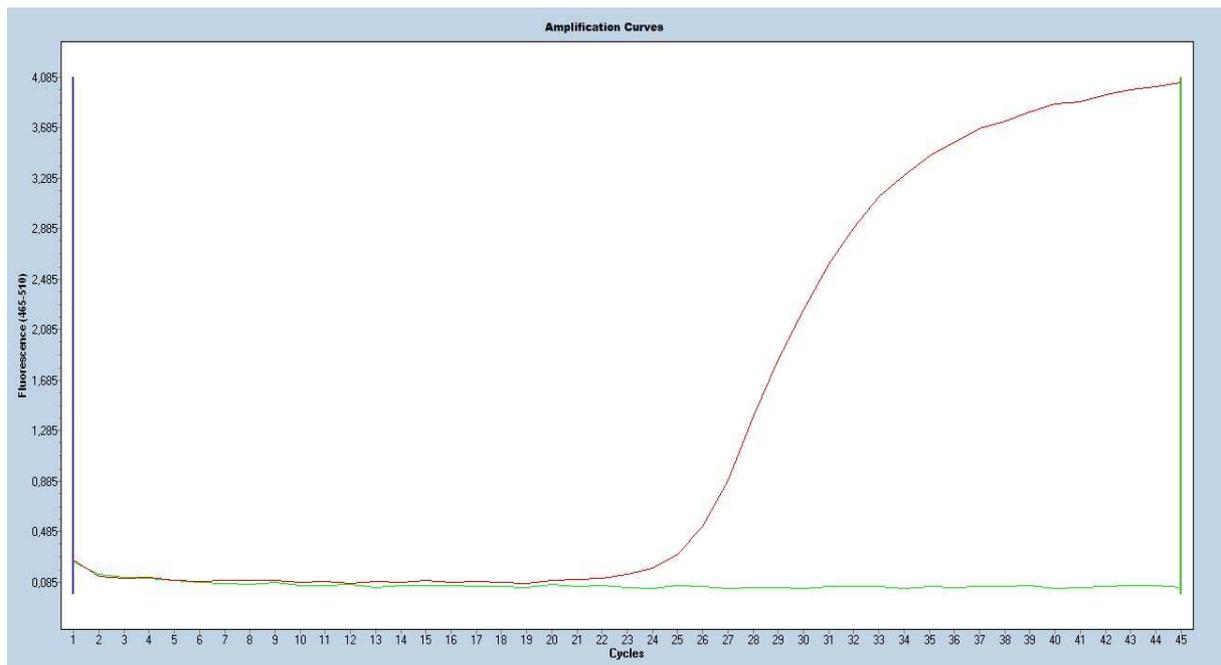
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

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

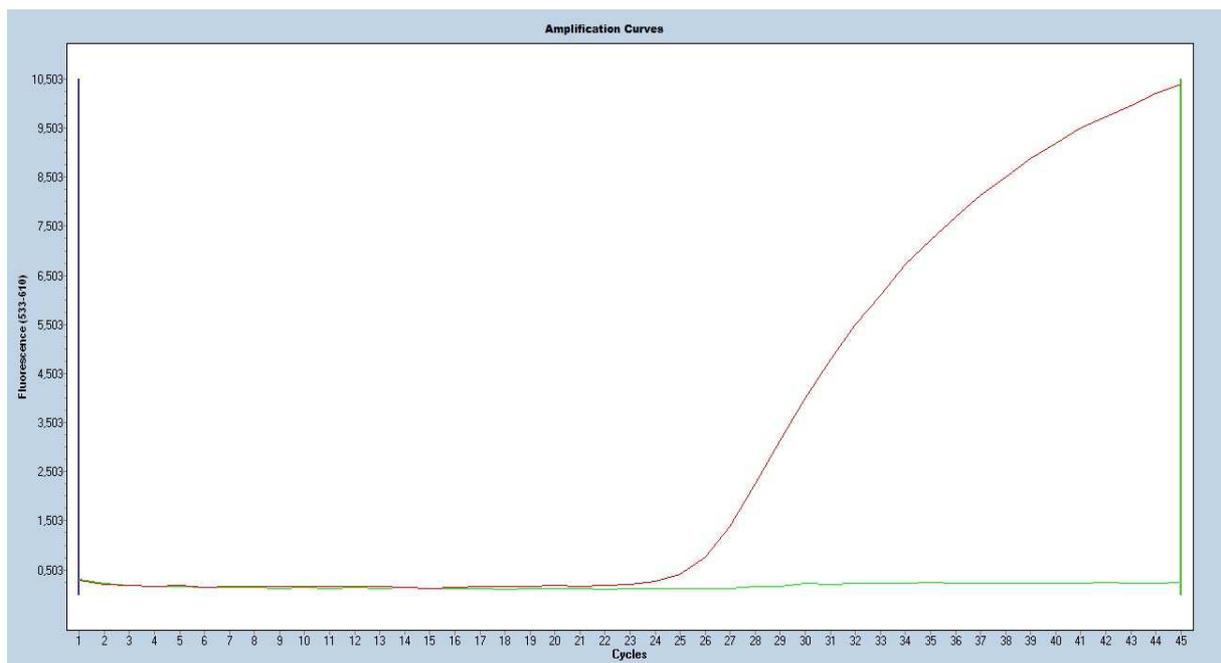
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



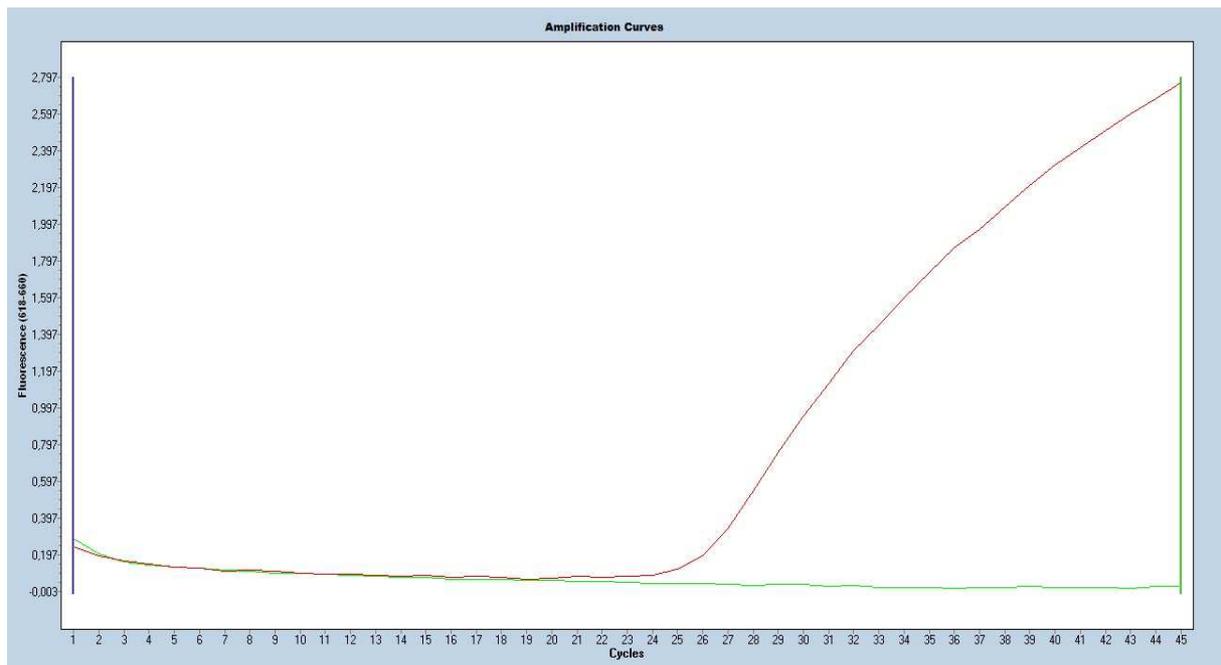
**Fig. 1 :** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Dientamoeba fragilis*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 2 :** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Giardia lamblia*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 3 :** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Entamoeba histolytica*) sur le LightCycler® 480II



**Figure 4 :** Exécution correcte des contrôles positif (rouge) et négatif (vert) (*Cryptosporidium* spp.) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 11.

**Tableau 11** : Interprétation des échantillons

Gènes cibles					
<i>D. fragilis</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Crypto. sp p.</i>	ICD	Résultat
positif	négatif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> détecté
négatif	positif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>G. lamblia</i> détecté
négatif	négatif	positif	négatif	positif/négatif	<i>E. histolytica</i> détecté
négatif	négatif	négatif	positif	positif/négatif	<i>Cryptosporidium spp.</i> détecté
positif	positif	négatif	négatif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> et <i>G. lamblia</i> détectés
positif	négatif	positif	négatif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> et <i>E. histolytica</i> détectés
positif	négatif	négatif	positif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
négatif	positif	positif	négatif	positif/négatif	<i>G. lamblia</i> et <i>E. histolytica</i> détectés
négatif	positif	négatif	positif	positif/négatif	<i>G. lamblia</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
négatif	négatif	positif	positif	positif/négatif	<i>E. histolytica</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
positif	positif	positif	négatif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> et <i>E. histolytica</i> détectés
positif	positif	négatif	positif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
positif	négatif	positif	positif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> , <i>E. histolytica</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
négatif	positif	positif	positif	positif/négatif	<i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
positif	positif	positif	positif	positif/négatif	<i>D. fragilis</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>E. histolytica</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	positif	Gènes cibles non détectés
négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	Non valide

Un échantillon est estimé positif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, et en présente un pour le **Internal Control DNA**.

Un échantillon est également estimé positif 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 **Internal Control DNA** 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 négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, et en présente un pour le **Internal Control DNA**. 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

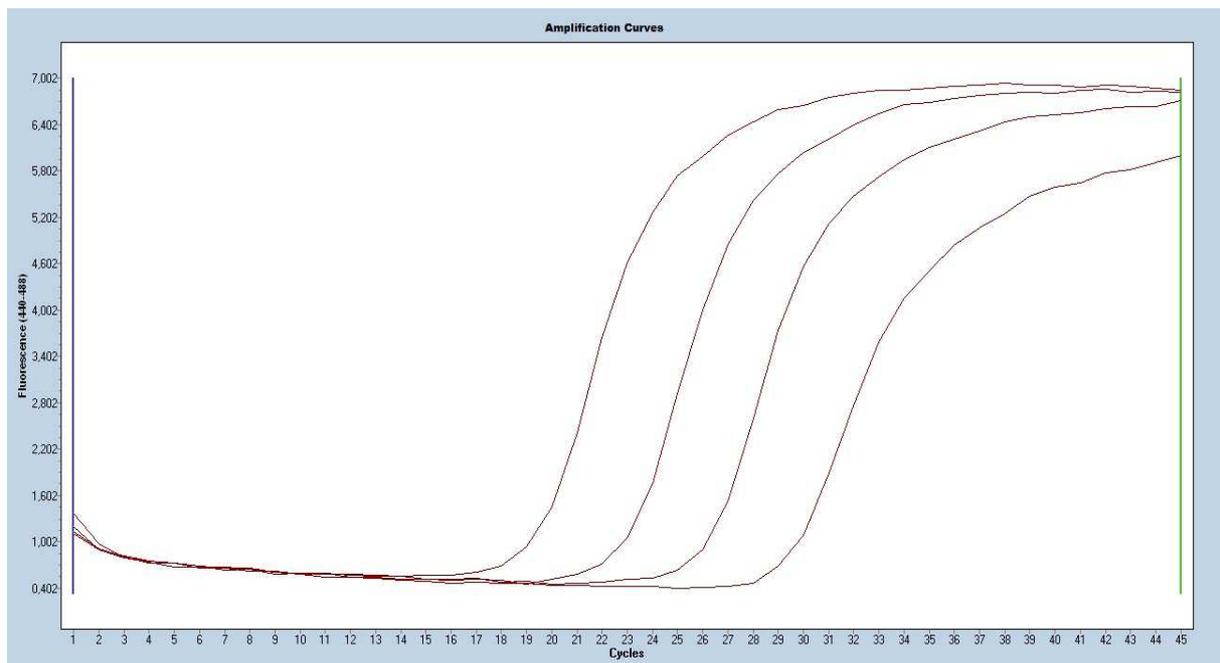
1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Les prélèvements, transport, stockage et traitement incorrects 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<sup>®</sup> GENE Parasitic 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 (ITS1-18S).

## 13. Performances

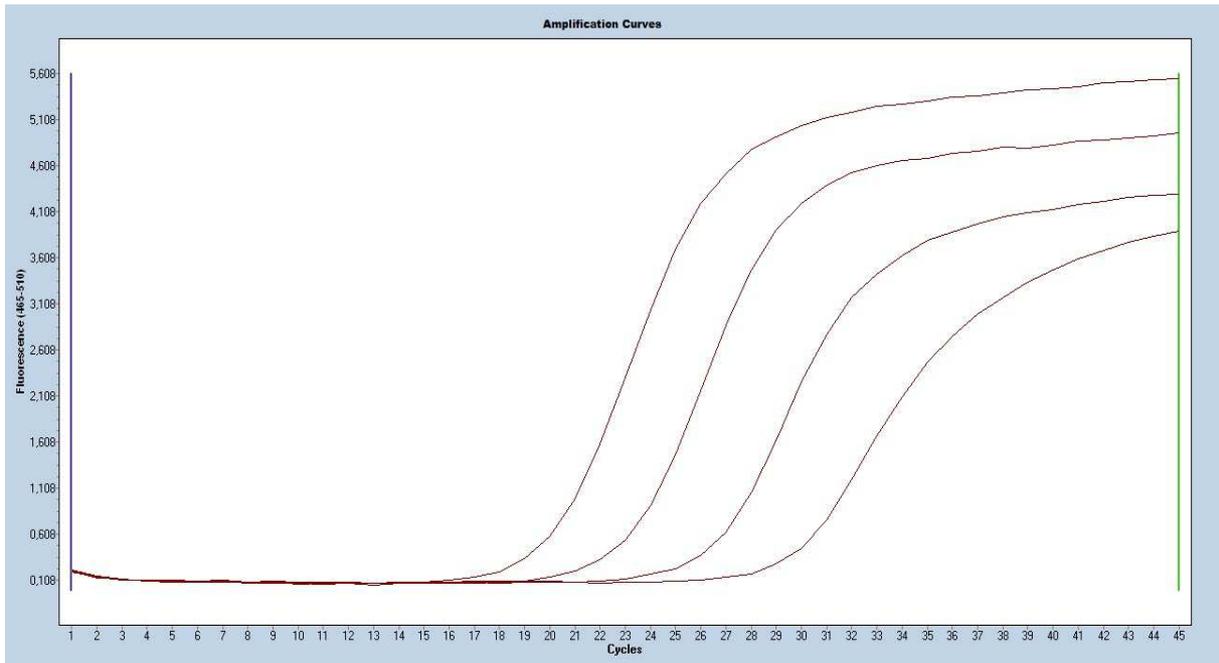
### 13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I est  $\geq 50$  copies d'ADN par réaction pour *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. Et *Entamoeba histolytica*, respectivement.

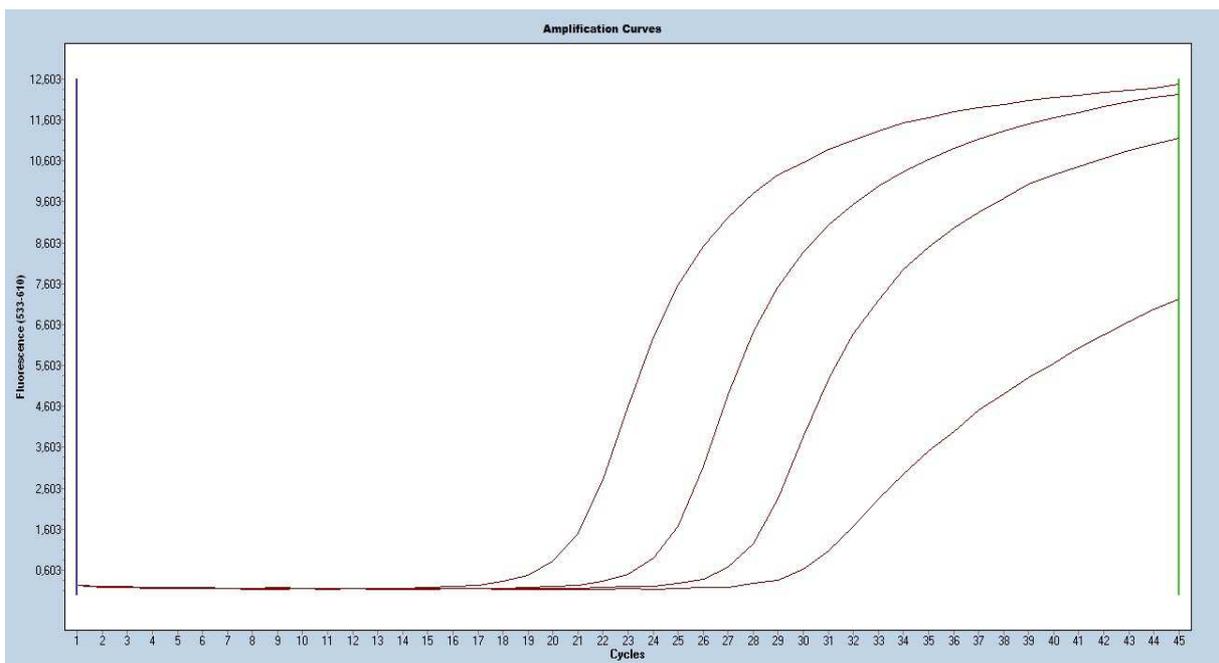
Les figures 5, 6, 7 et 8 suivantes montrent les séries de dilution de *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica* ( $10^5$  -  $10^2$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$  chacune) avec le LightCycler® 480II.



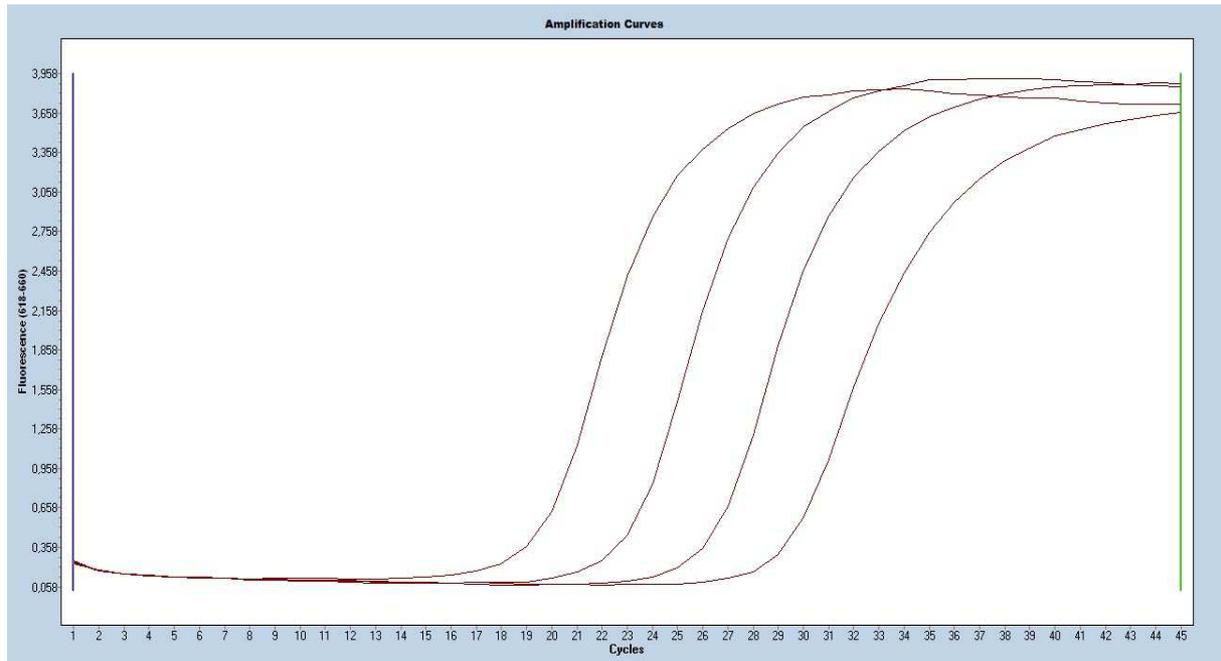
**Figure 5 :** Série de dilutions de *Dientamoeba fragilis* ( $10^5$  –  $10^2$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II



**Figure 6 :** Série de dilutions de *Giardia lamblia* ( $10^5 - 10^2$  copies d'ADN/ $\mu$ l) avec le LightCycler® 480II



**Figure 7 :** Série de dilutions d'*Entamoeba histolytica* ( $10^5 - 10^2$  copies d'ADN/ $\mu$ l) avec le LightCycler® 480II



**Figure 8 :** Série de dilutions de *Cryptosporidium* spp. ( $10^5 - 10^2$  copies d'ADN/ $\mu$ l) avec le LightCycler® 480II

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

## 13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Parasitic Stool Panel I est spécifique pour *Dientamoeba fragilis*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 12) :

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

Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	Échovirus Type 11	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Entamoeba dispar</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	Entérovirus Type 71	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	Norovirus GGI	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	Coxsackievirus B4	-	Norovirus GGII	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		

### 13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I a été analysée avec *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* et *Cryptosporidium* spp. (voir tableau 13). Toutes les souches de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* et *Cryptosporidium* spp. testées ont été détectées par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Parasitic Stool Panel I ou par alignement de séquences.

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

<i>Giardia lamblia</i>					
<i>Giardia lamblia</i>	+	<i>G. intestinales</i> Portland 1	+	<i>G. intestinales</i> WB Clone 6	+
<i>Entamoeba histolytica</i>					
<i>E. histolytica</i>	+				
<i>Cryptosporidium</i> spp.					
<i>C. baileyi</i> *	+	<i>C. hominis</i>	+	<i>C. sp, moufette</i> *	+
<i>C. bovis</i> *	+	<i>C. muris</i>	+	<i>C. ubiquitum</i> *	+
<i>C. canis</i> *	+	<i>C. parvum</i>	+	<i>C. viatorum</i> *	+
<i>C. cuniculus</i> *	+	<i>C. sp, cheval</i> *	+	<i>C. xiaoi</i> *	+
<i>C. felis</i> *	+				

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2019-04-09	Révision générale 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 7. Mesures de précaution 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 11. Interprétation des résultats 13. Performances 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

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

### Symboles spécifiques au test

Sans objet

## 16. Bibliographie

1. Centers for Disease Control and Prevention 2011. Giardia Epidemiology & Risk Factors, <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html>. Aufgerufen am 10.07.2012.
2. Food and Drug Administration (FDA) 2011. Bad Bug Book 2nd Edition. <http://www.fda.gov/food/foodsafety/foodborneillness/foodborneillnessfoodbornepathogensnaturaltoxins/badbugbook/default.htm>. Aufgerufen am 10.07.2012.
3. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/crypto/biology.html>. Aufgerufen am 07.03.2014.
4. Leitch GJ und Qing He. Cryptosporidiosis - an overview. J Biomed Res. 2012, 25(1): 1-16.
5. Lee JK *et al.* Prevalence of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum* in non-HIV patients in Jeollanam-do, Korea . Korean J Parasitol. 2005, 43(3):111-114.
6. Robert Koch Institut 2010. Kryptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*). RKI-Ratgeber für Ärzte 2004. Aufgerufen am 24.07.2012.
7. Scallan E *et al.* Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg Infect Dis. 2011, 17(1): 7-15.
8. Fotedar R *et al.* Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev. 2007, 20(3):511-532.
9. Stark D *et al.* A review of the clinical presentation of *dientamoebiasis*. Am J Trop Med Hyg. 2010, 82(4):614-9.
10. Baratt JLN *et al.* A review of *Dientamoeba fragilis* carriage in humans: several reasons why this organism should be considered in the diagnosis of gastrointestinal illness. Gut Microbes. 2011, 2(1):3-12.