

RIDA® UNITY Bacterial Stool Panel

REF UN2405



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Allemagne

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel, réalisé sur la plateforme RIDA[®]UNITY, est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ADN de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* dans des échantillons de selles humaines non traitées provenant de personnes présentant des signes et des symptômes de gastroentérite aiguë.

Le test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel est destiné à soutenir le diagnostic des infections bactériennes (*Campylobacter* spp. [*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*], *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica*) chez les patients présentant des symptômes de gastroentérite conjointement à d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. ou *Yersinia enterocolitica* et ne doivent pas être utilisés comme seule base de diagnostic.

Ce produit est destiné à un usage professionnel.

2. Résumé et explication du test

Les maladies diarrhéiques constituent un problème de santé important et provoquent environ 1,7 milliard de cas par an chez les enfants dans le monde⁽¹⁾. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), avec environ 525 000 décès par an, elles constituent la deuxième cause de décès chez les enfants de moins de 5 ans, en particulier dans les pays en développement⁽¹⁾. Les infections à *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* sont des causes fréquentes des cas de diarrhée bactérienne⁽²⁾.

Dans le monde, les espèces de *Campylobacter* sont l'une des quatre causes les plus fréquentes de diarrhée bactérienne.⁽³⁾ Aux États-Unis, ces agents pathogènes sont responsables d'environ 1,5 million de cas (campylobactériose) par an.⁽⁴⁾ Selon l'Institut Robert Koch (RKI), l'incidence en Allemagne est de 80 à 90 malades pour 100 000 personnes.⁽⁵⁾ L'écrasante majorité des infections à *Campylobacter* signalées sont causées par *C. jejuni*, dont l'incidence mondiale dépasse même celle d'*E. coli*.^(2, 3) *C. coli* est également une espèce importante du genre et est responsable de 1 à 25 % de tous les cas de diarrhée liés à *Campylobacter*.⁽³⁾ Les infections à *Campylobacter* chez l'être humain sont principalement liées à l'alimentation. Le principal mode de transmission est donc la consommation de viande contaminée, insuffisamment cuite, ainsi que de lait cru et d'eau contaminée. La dose infectieuse est relativement faible, soit 500 bactéries.⁽⁵⁾ Le temps d'incubation typique de *Campylobacter* spp. est compris entre 1 et 7 jours, avec divers symptômes de maladie. Les symptômes caractéristiques de la campylobactériose sont la diarrhée avec des selles aqueuses à sanglantes, la fièvre, la faiblesse et les douleurs d'estomac.^(2, 5)

Les espèces de *Salmonella* sont aussi l'une des principales causes de gastroentérite bactérienne dans le monde. Le genre *Salmonella* est divisé en 2 espèces,

S. enterica et *S. bongori*, et comprend actuellement environ 2 500 sérotypes. Les salmonelles peuvent provoquer trois formes de salmonellose : non invasive et non typhique, invasive et non typhique et fièvre typhoïde.⁽²⁾ Selon les CDC (Centers for Disease Control and Prevention), on dénombre environ 1,35 million de cas de salmonellose par an aux États-Unis, avec plus de 26 500 hospitalisations et 420 décès.⁽⁶⁾ La plupart des cas de salmonellose sont causés par *S. typhimurium* et *S. enteritidis*. Le typhus, quant à lui, est causé par *S. typhi* et *S. paratyphi* A, B ou C⁽⁷⁾. Dans le monde, on dénombre près de 22 millions de cas de typhus par an, dont 200 000 décès.⁽⁸⁾ Les salmonelles sont transmises par la consommation d'œufs ou de produits contenant des œufs mal préparés, de viande crue, d'eau contaminée ou par le contact avec des animaux infectés.⁽⁷⁾ La dose infectieuse des salmonelles varie de 1 à 1 000 bactéries. La salmonellose se manifeste, après une période d'incubation de 6 à 72 heures, par des symptômes cliniques tels que nausées, vomissements, crampes d'estomac, diarrhée, fièvre et maux de tête.^(2, 7) En l'espace de 2 à 3 jours, les personnes atteintes du typhus souffrent de maux de tête, de douleurs dans les membres, d'une forte fièvre (de 39 °C à 41 °C) et de douleurs abdominales⁽⁸⁾.

Yersinia enterocolitica est l'une des trois espèces de *Yersinia* (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*) du genre *Yersinia*. *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* peuvent provoquer une yersiniose intestinale. Selon les CDC, près de 117 000 cas de *Y. enterocolitica* se produisent chaque année aux États-Unis, avec 640 admissions à l'hôpital et 35 décès.⁽⁹⁾ Une infection par *Yersinia enterocolitica* provient d'aliments contaminés, notamment de viande de porc crue ou insuffisamment cuite, ou d'eau contaminée.⁽¹⁰⁾ Après une période d'incubation de 3 à 7 jours, les personnes atteintes de yersiniose souffrent de diarrhées, vomissements et douleurs abdominales. Les symptômes peuvent durer jusqu'à 3 semaines^(10, 11).

3. Principe du test

RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* dans des échantillons de selles humaines. Le traitement est entièrement automatisé avec le système RIDA[®]UNITY. Tout d'abord, les acides nucléiques sont extraits à l'aide de RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit et du Internal Control Kit.

La séquence cible est détectée dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape : la transcription inverse (RT) et la PCR ultérieure se produisent dans le même flacon de réaction. Pendant le processus, l'ARN isolé est transcrit en ADNc à l'aide de la transcriptase inverse. Les fragments de gènes spécifiques de *Campylobacter* spp. (ADNr 16S), *Salmonella* spp. (trr) et *Yersinia enterocolitica* (ystA/ystB) sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel.

Les séquences cibles amplifiées de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Y. enterocolitica* sont détectées à l'aide de sondes d'hydrolyse qui sont marquées avec un extincteur à une extrémité et avec un colorant fluorescent indicateur (fluorophore) à l'autre extrémité. Les sondes s'hybrident avec l'amplicon en présence d'une séquence cible. Pendant l'extension, la Taq-Polymerase sépare l'indicateur de l'extincteur. L'indicateur émet un signal fluorescent qui est détecté par l'unité optique d'un dispositif de PCR en temps réel. Le signal fluorescent augmente avec la quantité d'amplicons formés. Le RIDA[®]UNITY Internal Control Kit doit être utilisé en même temps pour pouvoir vérifier la préparation de l'échantillon et/ou l'inhibition potentielle de la PCR.

4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 96 déterminations.*

Tableau 1 : Contenu du paquet

Réactif	Quantité		Couleur du bouchon
Reaction Mix	1 ×	1935 µL	jaune, prêt à l'emploi
Enzyme Mix	1 ×	350 µL	rouge, prêt à l'emploi
Positive Control	1 ×	200 µL	bleu, prêt à l'emploi
Negative Control	1 ×	450 µL	blanc, prêt à l'emploi

*En cas d'utilisation répétée et en petites séries, le nombre de réactions peut être réduit.

5. Instructions de conservation des réactifs

- Respecter les consignes de manipulation figurant dans le tableau 2 et stocker le kit directement après utilisation conformément aux instructions.
- Tous les réactifs doivent être conservés à l'abri de la lumière, à une température comprise entre -16 °C et -28 °C et, s'ils ne sont pas ouverts, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. La garantie de qualité n'est plus valable après la date de péremption.
- Tous les réactifs doivent être soigneusement décongelés avant leur utilisation (p. ex., dans un réfrigérateur à 2 - 8 °C).
- La congélation et la décongélation répétées jusqu'à 8 fois n'affectent pas les propriétés du test.

- **Tableau 2** : Informations et conditions de conservation

	Température de conservation	Durée maximale de conservation
non ouvert	-16 °C à -28 °C	Utilisable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette
ouvert	-16 °C à -28 °C	8 cycles de congélation-décongélation

6. Réactifs requis, mais non fournis

Le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time RT-PCR est destiné exclusivement à être utilisé avec le système RIDA®UNITY. Les produits suivants sont absolument requis pour une utilisation correcte :

6.1 Réactifs

Les réactifs suivants sont nécessaires pour réaliser le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel :

Réactifs	Numéro d'article
RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (R-Biopharm AG)	UN0001
RIDA®UNITY Internal Control Kit (R-Biopharm AG)	UN0010

6.2 Matériel de laboratoire

Le matériel suivant est nécessaire pour réaliser le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel :

Matériel
Système RIDA®UNITY (R-Biopharm)
Consommables RIDA®UNITY (embouts, plaques, flacons de réaction, films). Voir le mode d'emploi du système RIDA®UNITY pour les informations relatives à la commande des consommables.
Agitateur-mélangeur vortex
Centrifugeuse de table
Gants jetables non poudrés

Le kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel peut être utilisé avec d'autres cycleurs compatibles. Les autres instruments de PCR en temps réel doivent être vérifiés/validés par l'utilisateur. Veuillez contacter R-Biopharm AG à l'adresse pcr@r-biopharm.de pour vérifier la compatibilité.

7. Mesures de précaution

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Ce test doit être réalisé uniquement par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.

Toujours respecter strictement le manuel d'utilisation lors de la réalisation du test.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec des plaies et des membranes muqueuses.

Lors de la manipulation des réactifs et des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test.

Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones de manipulation des échantillons.

Éviter de contaminer les échantillons et les composants du kit avec des microbes et des nucléases (DNase/RNase).

Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux, de même que tous les réactifs et le matériel exposés à des échantillons potentiellement infectieux, et doivent être éliminés comme il se doit. Ne pas échanger ou combiner les composants (Reaction Mix, Enzyme Mix, Positive Control, Negative Control) d'un lot d'un kit avec les composants d'un autre lot.

Le kit de test peut être utilisé dans les 4 semaines suivant la première ouverture et ne doit pas être utilisé après la date de péremption. Ces spécifications sont également vérifiées par le système RIDA®UNITY.

Après utilisation, les utilisateurs sont responsables de l'élimination correcte de tous les réactifs et matériaux. Pour l'élimination, respecter les règlements nationaux.

De plus amples informations sur la fiche de données de sécurité (Safety Data Sheet, SDS) sont disponibles sous le numéro d'article à l'adresse suivante

<https://clinical.r-biopharm.com/search/>.

Pour les utilisateurs de l'Union européenne : signaler tout événement indésirable grave associé au produit à R-Biopharm AG et aux autorités nationales compétentes.

Le résumé de la sécurité et des performances (SSP) de ce produit sera disponible à l'adresse <https://ec.europa.eu/tools/eudamed> dès que la base de données européenne sur les dispositifs médicaux (EUDAMED) sera mise en place. Dans la base de données, rechercher le dispositif en utilisant l'UDI-DI figurant sur l'emballage extérieur du dispositif.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Il est recommandé d'utiliser des échantillons frais pour obtenir les meilleures performances possibles du test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel.

Éviter de congeler et décongeler l'échantillon plusieurs fois.

Les échantillons de selles ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant des conservateurs, du sérum animal, des ions métal, des agents oxydants ou des détergents car ces substances peuvent interférer avec les tests RIDA®UNITY.

Il est recommandé de préparer des aliquotes des échantillons pour éviter des cycles répétés de décongélation/congélation. Les échantillons congelés doivent être décongelés immédiatement avant extraction pour éviter toute dégradation des acides nucléiques.

Veillez suivre les spécifications de conservation des échantillons dans le tableau 3, le tableau 4 et le tableau 5.

Tableau 3 : Conservation des échantillons – détection de *Campylobacter* spp.
(*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

Échantillons de selles natifs		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
≤ 7 jours	≤ 7 jours	≤ 3 mois / ≤ 6 mois

Dans l'éluat		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée de l'éluat jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

Tableau 4 : Conservation des échantillons – détection de *Salmonella* spp.

Échantillons de selles natifs		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
< 1 jour	≤ 7 jours	≤ 6 mois

Dans l'éluat		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons/de l'éluat jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

Tableau 5 : Conservation des échantillons – détection de *Yersinia enterocolitica*

Échantillons de selles natifs		
20 - 25 °C	2 - 8 °C	-20 °C / -80 °C
-	≤ 7 jours	≤ 6 mois

Dans l'éluat		
+30 °C	+4 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C / -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons/de l'éluat jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test.

8.1 Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ADN des échantillons de selles, utiliser le RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (UN0001). Suivre les procédures directes dans le mode d'emploi du RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (section : Préparation de l'acide nucléique à partir d'échantillons de selles).

9. Réalisation du test

Placer les échantillons et les réactifs du kit RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel sur le système RIDA®UNITY au début de l'utilisation.

Au préalable, mélanger correctement le **Reaction Mix**, **Negative Control**, et **Positive Control** au vortex. Ne pas mélanger le **Enzyme Mix** au vortex. Ensuite, centrifuger brièvement tous les composants.

Les tubes PCR des échantillons à analyser doivent être positionnés au préalable dans le cycleur PCR intégré.

Des supports sont disponibles pour charger correctement les réactifs et les consommables dans le système. Pour le processus de chargement, respecter les instructions du système RIDA®UNITY. Consulter les sections pertinentes du manuel du système RIDA®UNITY (section : Réalisation d'une analyse).

Le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel ne peut être utilisé qu'en combinaison avec le RIDA®UNITY Internal Control Kit. Cela permet de reconnaître rapidement une inhibition potentielle de la PCR, de vérifier l'intégrité des réactifs et de confirmer la réussite de l'extraction des acides nucléiques. La procédure est décrite dans le mode d'emploi du RIDA®UNITY Internal Control Kit (section : Réalisation du test).

Le traitement automatique est décrit dans le manuel du système RIDA®UNITY (section : Réalisation d'une analyse).

9.1 Réglages du dispositif

9.1.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®UNITY, le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel a été vérifié par rapport au profil universel. Il est ainsi possible de combiner les tests ADN et ARN entre eux. En général, la transcription inverse arrive donc en premier dans le profil universel.

Tableau 6 : Profil PCR en temps réel universel pour RIDA®UNITY

<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	Maximum

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

9.2 Réglage du canal de détection

Tableau 7 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Salmonella</i> spp.	FAM	SEEK channel Sal
	Internal Control	HEX	SEEK channel ICD
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ROX	SEEK channel Yers
	<i>Campylobacter</i> spp.	Cy5	SEEK channel Campy

10. Contrôle qualité - signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

Les échantillons sont évalués à l'aide du logiciel d'analyse RIDA®SEEK du système RIDA®UNITY. Le **Negative Control** et le **Positive Control** doivent afficher les résultats appropriés (voir tableau 8).

Le **Positive Control** est présent à une concentration de 10^3 copies/ μ L. Chaque analyse de PCR utilise une quantité totale de 5×10^3 copies.

Le **Negative Control** contient déjà le contrôle interne RIDA®UNITY. Comme les contrôles ne contiennent pas de matrice, aucun signal n'est à prévoir dans les canaux cibles. Des signaux positifs dans le canal IC avec lequel le contrôle interne est détecté sont indispensables (voir tableau 8).

Tableau 8 : Pour être valide, une analyse de PCR doit remplir les conditions suivantes :

Échantillon	Résultat	IC Ct	Ct gène cible
Contrôle positif	+	S/O*	Voir le Certificate of Analysis
Contrôle négatif	-	Ct > 20	0

* Aucune valeur de Ct pour l'IC n'est requise pour obtenir un résultat positif du contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées lors de la PCR, y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais que le contrôle positif est valide, toutes les réactions doivent être de nouveau analysées lors de la PCR, y compris les contrôles.

Si les valeurs spécifiées ne sont pas obtenues, vérifier les points suivants avant de renouveler le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé
- Procédure de test correcte

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir renouvelé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Interprétation des résultats

Les échantillons sont évalués et interprétés à l'aide du logiciel d'analyse du système RIDA®UNITY, RIDA®SEEK.

À l'heure actuelle, aucune méthode de référence ni aucun matériau de référence n'est reconnu(e) au niveau international pour la normalisation. La traçabilité métrologique des matériaux de contrôle par rapport aux étalons internes de R-Biopharm AG repose sur des amplicons d'ADN spécifiques.

Pour de plus amples informations sur la traçabilité métrologique, veuillez contacter R-Biopharm AG.

Les valeurs spécifiées, plages et autres précisions figurent sur le certificat d'analyse (Certificate of Analysis, CoA).

Tableau 9 : Interprétation des résultats*

Détection			IC	Résultat
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.		
+	-	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. détectable
-	+	-	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> détectable
-	-	+	+/-	<i>Campylobacter</i> spp. détectable
+	+	-	+/-	<i>Salmonella</i> spp. et <i>Yersinia enterocolitica</i> détectables
+	-	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp. et <i>Campylobacter</i> spp. détectables
-	+	+	+/-	<i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Campylobacter</i> spp. détectables
+	+	+	+/-	<i>Salmonella</i> spp., <i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Campylobacter</i> spp. détectables
-	-	-	+	Gènes cibles non détectables
-	-	-	-	Non valide

* + = positif
- = négatif

Un échantillon est positif si l'ADN de l'échantillon et le Internal Control présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Un échantillon est également positif si l'ADN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun signal pour le Internal Control. La détection du Internal Control n'est pas indispensable dans ce cas, car les concentrations élevées d'amplicons peuvent provoquer un signal faible ou absent du Internal Control.

Un échantillon est négatif si l'ADN de l'échantillon ne présente pas de signal d'amplification dans le système de détection, mais que le **Internal Control** présente un signal visible. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection du **Internal Control**.

Un échantillon est non valide si l'ADN de l'échantillon et le **Internal Control** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. Des inhibiteurs de la PCR sont présents dans l'échantillon ou une erreur est survenue pendant le processus d'extraction.

12. Limites de la méthode

1. Le test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel détecte l'ADN de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* dans des échantillons de selles humaines non traitées. Ce test ne permet pas d'établir de rapport entre la valeur de Ct mesurée et la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés au regard des symptômes cliniques dans leur ensemble.
2. Le diagnostic ne doit pas reposer uniquement sur le résultat du test de biologie moléculaire. Il doit toujours tenir compte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
3. Ce test est approuvé uniquement pour un traitement automatisé utilisant le système RIDA[®]UNITY.
4. Ce test est seulement vérifié pour les échantillons de selles.
5. Un échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects de l'échantillon ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
6. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
7. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* basés sur la PCR, des concentrations extrêmement faibles des séquences cibles sous la limite de détection (LoD 95 %) peuvent être détectées, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
8. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison de l'amorce ou de la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel.
9. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un résultat positif indique que les gènes cibles (*Salmonella* spp. [ttr], *Yersinia enterocolitica* [ystA/ystB], *Campylobacter* spp. [ADNr 16S, uniquement *C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*]) sont présents.
10. Ce test doit être réalisé conformément aux BPL (Bonnes pratiques de laboratoire). Les utilisateurs doivent suivre scrupuleusement les instructions du fabricant lors de la réalisation du test.

13. Performances

13.1 Performances cliniques

RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR a été comparé dans un laboratoire externe avec un test de référence avec un marquage CE.

Un total de 405 échantillons de selles provenant de patients présentant des symptômes cliniques d'une infection gastro-intestinale, qui ont été prétestés positifs ou négatifs pour *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica*, ont été analysés avec le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel et un test de référence avec un marquage CE.

Les résultats de chaque agent pathogène sont indiqués dans les tableaux 10 à 12 :

Tableau 10 : Détection de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*)

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i>, <i>C. lari</i>, <i>C. jejuni</i>)	Positif	118	0	118
	Négatif	11	276	287
	Total	129	276	405

Sensibilité relative (IC 95 %)	91,5 % (85,3 % - 95,7 %)
Spécificité relative (IC 95 %)	100 % (98,7 % - 100 %)

Tableau 11 : Détection de *Salmonella* spp.

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Salmonella</i> spp.	Positif	118	1	119
	Négatif	18	268	286
	Total	136	269	405

Sensibilité relative (IC 95 %)	86,8 % (79,9 % - 92,0 %)
Spécificité relative (IC 95 %)	99,6 % (97,9 % - 100 %)

Tableau 12 : Détection de *Yersinia enterocolitica*

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel - <i>Yersinia enterocolitica</i>	Positif	94	0	94
	Négatif	8	303	311
	Total	102	303	405

Sensibilité relative (IC 95 %)	92,2 % (85,1 % - 96,6 %)
Spécificité relative (IC 95 %)	100 % (98,8 % - 100 %)

13.2 Performances analytiques

13.2.1 Limite de détection (LoD 95 %)

Un échantillon de contrôle positif (échantillons de selles négatifs, enrichis) a été mesuré en cinq étapes de dilution (par étapes de 0,25 log) pour chaque cible et matrice, avec 20 réplicats par étape dans un lot, afin de déterminer la LoD. Cette analyse a été suivie d'une analyse probit. La LoD calculée a ensuite été confirmée à l'aide de 20 réplicats par cible et par matrice pour l'étape de dilution/concentration calculée.

Les souches suivantes ont été utilisées pour les tests :

Salmonella typhimurium : ATCC® 14028™

Yersinia enterocolitica : DSM 13030

Campylobacter jejuni : ATCC® 33291™

Campylobacter coli : ATCC® 43478™

Campylobacter lari : DSM 11375

Pour la détection de l'ADN de *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica* en utilisant le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel, les limites de détection (LoD) suivantes ont été identifiées sur le système RIDA®UNITY.

Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats de la limite de détection du test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel pour les paramètres *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica*.

	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
LoD	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter coli</i> : 14 028 CFU*/mL • <i>Campylobacter jejuni</i> : 8 128 CFU*/mL • <i>Campylobacter lari</i> : 2 762 CFU*/mL 	144 212 CFU/mL	102 565 CFU/mL

*CFU : Colony Forming Units

La LoD pour le paramètre *Campylobacter coli* dans les échantillons de selles a été déterminée à 14 028 CFU/mL.

La LoD pour le paramètre *Campylobacter jejuni* dans les échantillons de selles a été déterminée à 8 128 CFU/mL.

La LoD pour le paramètre *Campylobacter lari* dans les échantillons de selles a été déterminée à 2 762 CFU/mL.

La LoD pour le paramètre *Salmonella* spp. dans les échantillons de selles a été déterminée à 144 212 CFU/mL.

La LoD pour le paramètre *Yersinia enterocolitica* dans les échantillons de selles a été déterminée à 102 565 CFU/mL.

13.2.2 Spécificité analytique

Substances interférentes

La présence d'inhibiteurs de la PCR en temps réel et de substances interférentes peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides. De ce fait, les effets de diverses substances ont été étudiés, compte tenu de leur utilisation répandue en cas d'infections gastro-intestinales ou de leur présence répandue dans les échantillons correspondants.

Les substances susceptibles de modifier sensiblement les résultats du test ont d'abord été examinées au moyen d'un test d'interférence. Plusieurs substances susceptibles d'être présentes en tant que résidus de l'extraction, en raison de leur utilisation largement répandue pour traiter les infections gastro-intestinales (différents traitements pharmaceutiques ou médicaments sur ordonnance), ou encore en raison de leur présence répandue dans les échantillons de contrôle correspondants (par exemple, les mucines à la surface des muqueuses ou le sang), ont été initialement examinées à des concentrations élevées (trois fois la dose quotidienne ou simulation du cas le plus défavorable).

Aucune interférence n'a été identifiée pour les substances figurant dans le tableau 14.

Tableau 14 : Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Mucines	5 % (v/v)
Sang humain/hémoglobine	5 % (v/v)
Acide stéarique/acide palmitique	40 % (v/v)
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg comprimés pelliculés (azithromycine)	84 mg/mL (p/v)
Comprimés de charbon de bois	6,0 % (p/v)
Éthanol	5 % par rapport à l'éluat
Chlorhydrate de guanidinium	5 % par rapport à l'éluat

Réactivité croisée

Divers organismes (bactéries, parasites, champignons et virus) que l'on trouve couramment dans la matrice des selles ont été étudiés. Les micro-organismes étudiés dans le cadre de ce test ont été sélectionnés soit en raison de leur présence naturelle dans les échantillons de selles, soit en raison des symptômes qu'ils provoquent en tant que pathogènes gastro-intestinaux. Pour les analyses, on a utilisé des cultures de bactéries (entre 10^6 et 10^9 CFU/mL) ou de champignons, des surnageants de cultures de virus, des isolats ou des étalons LGS pour les organismes donnés.

RIDA[®]UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR est spécifique à *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp. et *Yersinia enterocolitica*. Aucune réactivité croisée avec les substances suivantes n'a été décelée (voir tableau 15) :

Tableau 15 : Organismes à réaction croisée potentielle

Organisme	Résultat du test*		
	<i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	-	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-	-
Astrovirus Type 2	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-
<i>Clostridium septicum</i>	-	-	-
<i>Clostridium sordellii</i>	-	-	-

<i>Clostridium sporogenes</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i> HK-9	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Giardia lamblia</i>	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus, souche Wa	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-

*- = négatif

13.2.4 Précision

La précision du test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel real-time PCR a été déterminée pour les niveaux de considération suivants.

Précision *intra*-essai : déterminée sur 5 échantillons de contrôle avec 20 réplicats chacun sur le RIDA®UNITY dans des conditions identiques.

Précision *inter*-essais : déterminée sur 5 échantillons de contrôle testés en double au cours de 20 analyses réalisées sur 10 jours (2 analyses par jour) par différents techniciens dans des conditions reproductibles.

Les tests de précision *intra*-essai et *inter*-essais ont été réalisés à l'aide de trois lots différents.

Les données relatives à la précision ont été obtenues en utilisant cinq échantillons de contrôle, ainsi que le PTC et le NTC du test.

Les coefficients de variation obtenus pour chaque mesure à l'aide du test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel real-time PCR sur le RIDA®UNITY étaient inférieurs à 4,19 %.

Tableau 16 : Résultats de la précision pour le test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel pour *Campylobacter* spp. (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*).

Valeur moyenne Ct / CV	Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots	
	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 3	
1	Ct	24,31	25,0	24,3	23,4	23,4	24,3	23,4
	CV (%)	0,95	0,43	0,35	1,86	1,81	1,90	1,86
2	Ct	31,3	31,2	31,4	27,9	27,9	27,9	27,9
	CV (%)	0,77	0,59	0,74	4,19	3,82	3,84	3,96
3	Ct	30,8	30,6	30,5	30,4	30,1	30,2	30,3
	CV (%)	0,49	0,67	0,84	1,73	2,44	1,73	2,00
4	Ct	29,0	28,9	29,3	29,1	28,9	29,0	29,0
	CV (%)	0,41	0,30	0,80	3,08	2,99	3,01	3,03
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o

Tableau 17 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel pour *Salmonella* spp.

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 3
1	Ct	23,6	23,7	23,7	23,6	23,7	23,6	23,7
	CV (%)	0,86	0,41	0,39	1,34	1,32	1,44	1,37
2	Ct	30,4	30,4	30,4	27,0	26,9	27,0	27,0
	CV (%)	0,71	0,58	0,74	1,31	1,24	1,29	1,27
3	Ct	30,3	30,3	30,1	30,2	30,2	30,2	30,2
	CV (%)	0,38	0,65	0,74	1,02	1,03	1,20	1,09
4	Ct	27,3	27,2	27,3	27,9	27,8	27,8	27,9
	CV (%)	0,54	0,54	0,60	1,30	1,22	1,21	1,24
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	s/o						

Tableau 18 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel pour *Yersinia enterocolitica*.

Valeur moyenne Ct / CV		Intra-essai			Inter-essais			Inter-lots
		Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot du kit 1	Lot du kit 2	Lot du kit 3	Lot des kits 1 à 3
1	Ct	25,1	26,1	25,2	24,4	24,4	24,4	24,4
	CV (%)	0,84	0,36	0,58	1,61	1,61	1,70	1,64
2	Ct	32,6	32,5	32,4	28,6	28,5	28,4	28,5
	CV (%)	1,63	1,15	1,31	1,51	1,45	1,78	1,58
3	Ct	31,9	31,8	31,8	31,5	31,4	31,4	31,4
	CV (%)	0,81	0,91	1,08	1,60	1,58	1,45	1,54
4	Ct	29,1	29,0	29,2	29,7	29,6	29,7	29,7
	CV (%)	0,63	0,54	0,59	2,22	2,22	2,19	2,21
5	Ct	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	s/o						

13.2.5 Réactivité analytique

La réactivité du RIDA®UNITY Bacterial Stool Panel multiplex real-time PCR a été évaluée par rapport à plusieurs sérotypes de *Salmonella*, des espèces de *Campylobacter* et des sous-espèces de *Yersinia enterocolitica* (voir tableau 19).

Tableau 19 : Test de la réactivité analytique

Souche	Concentration	Résultat*		
		<i>Campylobacter</i> spp. (<i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> , <i>C. jejuni</i>)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Campylobacter coli</i>	6,5 x 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	1,5 x 10 ³ CFU/mL	+	-	-
<i>Campylobacter lari</i> ssp. <i>lari</i>	1,04 x 10 ² CFU/mL	+	-	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Typhi	1,49 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Typhimurium	7,7 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Enteritidis	3,3 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Paratyphi A	1,75 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Paratyphi B	2,08 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Paratyphi C	1,1 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Newport	3,1 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Heidelberg	5,9 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Javiana	1,79 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Dublin	2,88 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Agona	1,91 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Choleraesuis	9,6 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Infantis	1,3 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotype Montevideo	8,4 x 10 ³ CFU/mL	-	+	-

<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotipe <i>Anatum</i>	2,38 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotipe <i>Mississippi</i>	2,27 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>S. enterica</i> ssp. <i>enterica</i> sérotipe <i>Bareilly</i>	1,43 x 10 ⁴ CFU/mL	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>enterocolitica</i>	4,2 x 10 ³ CFU/mL	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> ssp. <i>palaearctica</i>	4,9 x 10 ³ CFU/mL	-	-	+

*+ = positif (au moins 2 répliqués positifs sur 3)

- = négatif

14. Historique des versions

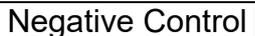
Numéro de version	Section et désignation
2022-04-28	Version de la publication

15. Signification des symboles

Symboles généraux

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

Symboles spécifiques aux tests

	Mélange réactionnel
	Mélange d'enzymes
	Contrôle négatif
	Contrôle positif

16. Références

1. World Health Organisation. Diarrhoeal disease 2017, May 2 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease#:~:text=Infection%3A%20Diarrhoea%20is%20a%20symptom%20of%20infections%20caused,and%20safe%20water%20for%20drinking%2C%20cooking%20and%20cleaning.>] 2021-09-07
2. Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5).
3. Costa D, Iraola G. Pathogenomics of Emerging Campylobacter Species. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4).
4. Centers for Disease Control and Prevention. Campylobacter (Campylobacteriosis) 2021 [Available from: <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>.] 2021-09-07
5. Institut RK. Campylobacter-Enteritis 2018 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Campylobacter.html.] 2021-09-07
6. Centers for Disease Control and Prevention. Salmonella 2019 [Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>.
7. Robert Koch Institut. Salmonellose 2016 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Salmonellose.html.] 2021-09-07
8. Robert Koch Institut. Typhus abdominalis, Paratyphus. 2015.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Yersinia enterocolitica (Yersiniosis) 2016 [Available from: <https://www.cdc.gov/yersinia/index.html>.] 2021-09-07
10. Rosner BM, Stark K, Werber D. Epidemiology of reported Yersinia enterocolitica infections in Germany, 2001-2008. *BMC Public Health*. 2010;10(1):337.
11. Robert Koch Institut. Yersiniose 2019 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Yersiniose.html.] 2021-09-07