



RIDA® UNITY Parasitic Stool Panel II

REF UN1725



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

+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 Parasitic Stool Panel II, réalisé sur la plateforme RIDA® UNITY, est une PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'ADN de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica* dans les échantillons de selles humaines non traitées provenant de personnes présentant des signes et symptômes d'infection gastro-intestinale.

Le test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II est destiné à soutenir le diagnostic des infections parasitaires (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica*) chez les patients présentant des symptômes d'infection gastro-intestinale en relation avec d'autres résultats cliniques et de laboratoire.

Des résultats négatifs n'excluent pas la possibilité d'une infection parasitaire (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica*) 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

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

Dans le monde, *Giardia lamblia*, également connu sous le nom de *G. intestinalis* ou *G. duodenalis*, est à l'origine de maladies diarrhéiques, aussi appelées giardiase. Environ 500,000 nouveaux cas sont signalés chaque année⁽¹⁾. La prévalence de la giardiase varie de 2 à 7% dans les pays industrialisés et de 20 à 30% dans les pays en développement⁽²⁾. L'infection se produit par l'ingestion de kystes dans l'eau ou les aliments contaminés, ou par la voie oro-fécale. La giardiase aiguë se développe après une période d'incubation de 15 à 30 jours et dure généralement de 1 à 3 semaines. Les symptômes d'une infection aiguë sont la diarrhée pâteuse et malodorante, les douleurs abdominales, les ballonnements, les nausées et les vomissements. Il existe cependant aussi des cas chroniques et même des porteurs asymptomatiques⁽³⁾.

Cryptosporidium parvum est l'une des différentes espèces du genre *Cryptosporidium*. *C. parvum* et *C. hominis* sont parmi les causes les plus courantes de cryptosporidiose chez l'être humain et sont responsables de plus d'un million de décès par an. Cependant, les infections causées par d'autres *Cryptosporidium* spp. comme *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. canis* et *C. muris* peuvent également entraîner des symptômes cliniques⁽⁴⁾. Entre 2009 et 2017, 444 épidémies de cryptosporidiose ont été signalées aux États-Unis, entraînant 7 465 cas, 287 hospitalisations et un décès⁽⁵⁾. L'infection se produit principalement par l'ingestion d'ovocytes contenant des sporozoïtes dans l'eau et les aliments contaminés, et par la transmission oro-fécale entre êtres humains. Les symptômes de la cryptosporidiose vont des cas asymptomatiques à une diarrhée aqueuse grave, en passant par des douleurs abdominales, des nausées et de la fièvre. La dose d'infection à laquelle 50% des

personnes exposées sont infectées est faible, soit 10-1 000 ovocytes. Chez les personnes immunocompétentes, les symptômes durent au total environ 1 à 2 semaines. Les personnes atteintes d'immunodéficiences, comme les patients séropositifs au VIH, peuvent souffrir d'une cryptosporidiose beaucoup plus grave, plus longue et potentiellement mortelle⁽⁴⁾. Dans ces cas, l'évolution de la maladie dépend du degré de faiblesse du système immunitaire^(6,7).

Entamoeba histolytica est la seule espèce pathogène pour l'être humain du genre *Entamoeba* et provoque des infections du tractus gastro-intestinal, également appelées amibiases. L'infection se produit par voie oro-fécale par l'ingestion de kystes dans l'eau et les aliments contaminés, mais elle peut également se transmettre d'une personne à l'autre^(8, 9). Chaque année, environ 50 millions d'infections se produisent, entraînant 40,000 à 110,000 décès⁽⁸⁾. Environ 90% des infections sont asymptomatiques. Dans les cas symptomatiques, les symptômes peuvent se développer en 2 à 4 semaines et comprennent la diarrhée, des douleurs abdominales et de la fièvre, ainsi que des maladies graves, telles que le granulome amibien (amébose), qui se définit comme une masse qui s'est formée dans le côlon⁽⁹⁾.

3. Principe du test

Le test RIDA[®]UNITY Parasitic Stool Panel II est une PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe de l'ADN de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica* 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 du RIDA[®]UNITY Universal Extraction Kit et du Internal Control Kit.

La séquence cible est toujours détectée dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape (même pour les tests de l'ADN) : la transcription inverse (RT) et la PCR ultérieure se produisent dans le même flacon de réaction. Pendant le processus, l'ARN isolé (si présent) est transcrit en ADNc à l'aide de la transcriptase inverse. Les fragments de gènes spécifiques de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S) sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel.

Les séquences cibles amplifiées 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

RÉF.	Réactif	Quantité		Couleur du bouchon
UNZ1725RM	Reaction Mix	1 x	1935 µL	jaune, prêt à l'emploi
UNZ1725EM	Enzyme Mix	1 x	350 µL	rouge, prêt à l'emploi
UNZ1725PC	Positive Control	1 x	200 µL	bleu, prêt à l'emploi
UNZ1725NC	Negative Control	1 x	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 (par exemple, dans un réfrigérateur entre 2°C et 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 Parasitic Stool Panel II 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 Parasitic Stool Panel II :

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 Parasitic Stool Panel II :

Matériel
Système RIDA®UNITY ; numéro d'article : ZUNITY (R-Biopharm AG)
Consommables RIDA®UNITY (pointes, 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

Cycleur externe (amélioration possible du système)
CFX96™ Dx (Bio-Rad)

Le kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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 par e-mail à 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.

Le mode d'emploi du test doit être respecté à la lettre.

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 pendant 8 semaines après sa première ouverture (le kit peut être rechargé jusqu'à 6 fois). Ne pas utiliser le kit de test après sa 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.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

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

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.

Respecter les instructions de stockage des échantillons dans les tableaux 3 à 5.

Tableau 3 : Conservation des échantillons - détection de *Giardia lamblia*

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

Dans l'éluat		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -20 °C ou -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons jusqu'à 5 fois n'affecte pas les propriétés du test.

En cas de conservation à -20 °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 d'*Entamoeba histolytica*

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

Dans l'éluat		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

En cas de conservation à -80 °C, la congélation/décongélation répétée des échantillons jusqu'à 3 fois n'affecte pas les propriétés du test. La congélation et la décongélation répétées des échantillons conservés à -20 °C doivent être évitées pour ces analytes.

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

Tableau 5 : Conservation des échantillons - détection de *Cryptosporidium* spp.

Échantillons de selles natifs			
20 °C - 25 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C	-80 °C
< 1 jour	≤ 7 jours	≤ 3 mois	≤ 6 mois

Dans l'éluat		
30 °C	2 °C - 8 °C	-20 °C
≤ 24 heures	≤ 36 heures	≤ 7 jours

L'analyte *Cryptosporidium* spp. est stable après congélation/décongélation répétée de l'échantillon de selles à -80 °C pendant cinq cycles de congélation/décongélation et à -20 °C pendant trois cycles de congélation/décongélation.

En cas de conservation à -20 °C, la congélation/décongélation répétée 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. Suivre les procédures correctes dans le mode d'emploi du RIDA®UNITY Universal Extraction Kit (section : Préparation de l'acide nucléique à partir d'échantillons de selles ; section : Préparation de l'acide nucléique à partir d'échantillons de culture).

9. Réalisation du test

Placer les échantillons et les réactifs du kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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 Parasitic Stool Panel II 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 Paramètres d'instrument

9.1.1 Profil universel de PCR en temps réel

Pour harmoniser les tests RIDA®UNITY, le test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II 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.

Tableau 7 : Profil universel de PCR en temps réel pour CFX96™ Dx

<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	Maximum

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

9.2 Réglage du canal de détection

Tableau 8 : Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
R-Biopharm RIDA®UNITY	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	SEEK channel Giardia
	Contrôle interne	HEX	SEEK channel ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	SEEK channel Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	SEEK channel Crypto
Bio-Rad CFX96™ Dx	<i>Giardia lamblia</i>	FAM	SEEK channel Giardia
	Contrôle interne	VIC	SEEK channel ICD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	ROX	SEEK channel Enta
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cy5	SEEK channel Crypto

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 9).

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 9).

Tableau 9 : 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 certificat d'analyse (Certificate of Analysis, CoA)
Contrôle négatif	-	Ct > 20	0

*Dans certaines circonstances, le canal IC peut avoir un signal positif dans le contrôle positif et ne doit donc pas être évalué.

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. Évaluation et interprétation

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

Il n'existe actuellement aucune méthode de référence ou aucun matériau de référence reconnu 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 10 : Interprétation des résultats*

Détection de			ICD	Résultat
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium spp.</i>		
+	-	-	+/-	<i>Giardia lamblia</i> détectable
-	+	-	+/-	<i>Entamoeba histolytica</i> détectable
-	-	+	+/-	<i>Cryptosporidium spp.</i> détectable
+	+	-	+/-	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> détectables
+	-	+	+/-	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> détectables
-	+	+	+/-	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> détectables
+	+	+	+/-	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i> et <i>Cryptosporidium spp.</i> 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 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 Parasitic Stool Panel II détecte l'ADN de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica* dans les 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. Lors de l'utilisation de la matrice de culture, ne pas transférer le milieu gélosé dans la réaction PCR, car cela peut entraîner des interférences potentielles.
6. Un échantillonnage, transport, stockage et traitement incorrects ou une charge pathogène inférieure à la sensibilité analytique du test peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
7. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats faux négatifs ou non valides.
8. 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.
9. Des mutations ou polymorphismes au niveau des sites de liaison des amorces ou des sondes peuvent empêcher la détection de nouveaux variants ou de variants inconnus et entraîner des résultats faux négatifs avec le test RIDA[®]UNITY Parasitic Stool Panel II.
10. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Un test positif indique la présence de fragments de gènes spécifiques pour *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica* (ITS1-18S).
11. 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 Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR a été comparé dans un laboratoire externe avec un test de référence avec un marquage CE à partir de 278 échantillons de selles provenant de patients présentant des symptômes d'infection gastro-intestinale.

Les résultats montrent une sensibilité et une spécificité élevées dans la détection de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* et *Cryptosporidium spp.* en utilisant le kit RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II.

Tableau 11 : Détection de *Giardia lamblia*

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Giardia lamblia</i>	Positif	77	1	78
	Négatif	8	192	200
	Total	85	193	278

Sensibilité relative (IC 95%)	90,6% (82,3% - 95,8%)
Spécificité relative (IC 95%)	99,5% (97,1% - 100%)

Tableau 12 : Détection d'*Entamoeba histolytica*

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Entamoeba histolytica</i>	Positif	70	1	71
	Négatif	7	200	207
	Total	77	201	278

Sensibilité relative (IC 95%)	90,9% (82,2% - 96,3%)
Spécificité relative (IC 95%)	99,5% (97,3% - 100%)

Tableau 13 : Détection de *Cryptosporidium spp.*

		PCR de référence		Total
		Positif	Négatif	
RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II- <i>Cryptosporidium spp.</i>	Positif	74	1	75
	Négatif	1	202	203
	Total	75	203	278

Sensibilité relative (IC 95%)	98,7% (92,8% - 100%)
Spécificité relative (IC 95%)	99,5% (97,3% - 100%)

13.2 Performances analytiques

13.2.1 Limite de détection (LoD 95%)

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

Les souches suivantes ont été utilisées pour les tests :

- *Cryptosporidium* spp. à partir d'échantillons groupés de selles cliniques positives (MF171865 et MF172060) ; concentration initiale non connue ; plage de Ct de 24-25
- *Giardia lamblia* à partir d'échantillons groupés de selles cliniques positives (34544905 et 34504696) ; concentration initiale inconnue ; Ct compris entre 29 et 30.
- *Entamoeba histolytica* CF (ATCC® 30015™) ; concentration initiale $2,7 \times 10^6$ cellules/mL

Les limites de détection suivantes ont été déterminées pour la détection de l'ADN de *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica* en utilisant le test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II sur le système UNITY

Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 14.

Tableau 14 : Résultats de la limite de détection du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour les paramètres *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* et *Entamoeba histolytica*.

	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
LoD	1,68E-2 facteur de dilution** (Ct 35,34 ± 0,72)	9,53 cellules/mL	1,98E-2 facteur de dilution* (Ct 36,18 ± 2,05)

* Dilution relative de la concentration du stock. Échantillon cliniquement positif avec une concentration initiale Ct 24-25

** Dilution relative de la concentration de la solution mère. Échantillon cliniquement positif avec une concentration initiale Ct 29-30

La LoD pour *Giardia lamblia* dans les échantillons de selles a été identifiée à un facteur de dilution de 1,68E-2.

La LoD pour *Entamoeba histolytica* dans les échantillons de selles a été identifiée à 9,53 cellules/mL.

La LoD pour *Cryptosporidium* spp dans les échantillons de selles a été identifiée à un facteur de dilution de 1,98E-2.

Pour le flux de travail amélioré utilisant le CFX96™ Dx,, ces valeurs de LoD ont été confirmées en supposant que de rester dans une fourchette de 2 à 3 fois la plage de la LoD.

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 d'influencer de manière significative les résultats des tests ont été examinées dans un premier temps à des concentrations élevées (le triple de la dose quotidienne ou la simulation du pire cas) dans un test d'interférence. Aucune interférence n'a été identifiée pour les substances figurant dans le tableau 15.

Tableau 15 : Substances potentiellement interférentes

Substance potentiellement interférente	Concentration
Azithromycin-ratiopharm® 500 mg comprimés pelliculés (azithromycine)	0,75% [p/v]
Édulcorant liquide Cologran® (saccharine + cyclamate)	1,3% [p/v]
Sang humain	5% [v/v]
Comprimés de charbon de bois 250 mg (charbon de bois)	6% [p/v]
Mucines	5% [p/v]
Acide stéarique/acide palmitique	40% [p/v]

Réactions croisées

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 10⁶ et 10⁹ CFU/mL), des cultures de champignons, des cultures de virus, des surnageant de culture de virus, des isolats ou des étalons LGC pour les organismes respectifs.

RIDA[®]UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR est spécifique pour *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. et *Entamoeba histolytica*.

Aucune réactivité croisée avec les substances suivantes n'a été décelée (voir tableau 16) :

Tableau 16 : Organismes à réaction croisée potentielle

Organisme	Résultat du test*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	-	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	-	-
Astrovirus	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> sous-esp. <i>Fetus</i>	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> sous-esp. <i>lari</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>	-	-	-
Coxsackievirus B4	-	-	-
<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	-	-
<i>E. coli</i> (O6)	-	-	-
Échovirus type 11	-	-	-
<i>Entamoeba dispar</i>	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
Entérovirus, type 71	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
Norovirus GI	-	-	-
Norovirus GII	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Rotavirus	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-

*- = négatif

13.2.3 Précision

La précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex 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 coefficients de variation obtenus pour chaque mesure en utilisant le test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR sur le RIDA®UNITY et le CFX96™ Dx étaient de 5,06 %.

Tableau 17 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour *Giardia lamblia* à partir d'échantillons de selles (système RIDA®UNITY).

Valeur Ct moyenne/ CV		<i>Intra</i> -essai			<i>Inter</i> -essais			<i>Inter</i> -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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O
2	Ct	34,3	34,5	34,0	35,0	34,8	35,2	35,0
	CV (%)	2,40%	1,73%	1,60%	2,38%	2,22%	2,23%	2,31%
3	Ct	34,9	35,2	34,2	35,5	35,2	35,3	35,3
	CV (%)	2,14%	1,88%	2,28%	3,05%	2,29%	2,50%	2,63%
4	Ct	33,1	33,4	33,2	33,0	33,0	33,0	33,0
	CV (%)	1,67%	1,60%	1,45%	1,96%	1,93%	2,01%	1,97%
5	Ct	33,3	33,7	33,6	33,8	33,6	33,6	33,0
	CV (%)	1,73%	1,74%	1,46%	1,82%	1,91%	1,81%	1,97%

Tableau 18 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour *Giardia lamblia* à partir d'échantillons de selles (CFX96™ Dx).

Valeur Ct moyenne/ 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	-	-	-	-	-	-	-
	CV (%)	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O
2	Ct	35,0	35,5	34,9	35,3	35,1	35,2	35,2
	CV (%)	2,76%	1,86%	2,51%	1,97%	2,26%	2,27%	2,22%
3	Ct	35,8	35,8	35,3	35,5	35,3	35,2	35,3
	CV (%)	2,83%	2,52%	2,32%	2,56%	2,41%	2,57%	2,47%
4	Ct	33,2	33,2	33,3	32,9	32,9	32,8	32,9
	CV (%)	2,08%	2,18%	2,16%	2,10%	1,54%	1,64%	1,78%
5	Ct	34,1	34,7	33,7	33,7	33,6	33,6	33,6
	CV (%)	1,81%	1,88%	2,39%	1,77%	1,90%	1,79%	1,82%

Tableau 19 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour *Entamoeba histolytica* à partir d'échantillons de selles (système RIDA®UNITY).

Valeur Ct moyenne/ 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	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
2	Ct	31,9	32,2	32,1	34,5	34,3	34,5	34,4
	CV (%)	5,46%	1,30%	1,29%	3,33%	2,86%	3,68%	3,31%
3	Ct	31,5	31,9	30,4	33,6	33,5	33,6	33,6
	CV (%)	2,14%	1,89%	3,16%	2,81%	3,24%	3,53%	3,21%
4	Ct	29,7	30,4	30,0	30,7	30,7	30,8	30,7
	CV (%)	0,85%	0,87%	1,34%	1,94%	1,69%	2,02%	1,89%
5	Ct	31,3	32,8	32,6	31,9	31,8	31,9	31,9
	CV (%)	3,21%	4,73%	2,47%	2,60%	2,23%	2,71%	2,52%

Tableau 20 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour *Entamoeba histolytica* à partir d'échantillons de selles (CFX96™ Dx).

Valeur Ct moyenne/ 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	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
2	Ct	32,4	32,8	32,2	33,9	33,8	33,7	33,8
	CV (%)	2,12%	2,21%	2,12%	2,63%	3,02%	3,00%	2,89%
3	Ct	31,7	31,7	31,3	33,0	32,9	32,7	32,9
	CV (%)	2,02%	1,71%	1,95%	3,16%	2,55%	2,71%	2,82%
4	Ct	30,0	29,6	29,5	30,4	30,5	30,4	30,5
	CV (%)	0,60%	0,76%	0,72%	1,98%	1,63%	1,79%	1,81%
5	Ct	32,6	33,3	32,0	31,3	31,4	31,3	31,3
	CV (%)	2,09%	3,68%	2,23%	2,01%	1,78%	1,58%	1,80%

Tableau 21 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour *Cryptosporidium* spp. à partir d'échantillons de selles (système RIDA®UNITY).

Valeur Ct moyenne/ 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	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
2	Ct	31,5	32,9	33,3	32,0	34,7	34,3	33,7
	CV (%)	2,25%	1,61%	1,41%	1,83%	3,15%	2,74%	5,06%
3	Ct	33,8	35,0	34,4	32,8	35,4	35,0	34,4
	CV (%)	2,92%	2,31%	1,95%	2,42%	3,27%	3,40%	5,03%
4	Ct	27,3	28,1	28,3	26,6	28,8	28,6	28,0
	CV (%)	0,70%	1,15%	0,90%	1,41%	2,86%	2,60%	4,94%
5	Ct	28,5	29,7	29,5	27,2	29,4	29,3	28,6
	CV (%)	0,70%	1,04%	0,94%	1,57%	2,82%	2,47%	4,84%

Tableau 22 : Résultats de la précision du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II pour *Cryptosporidium spp.* à partir d'échantillons de selles (CFX96™ Dx).

Valeur Ct moyenne/ 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	-	-	-	-	-	-	
	CV (%)	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
2	Ct	30,5	32,3	31,8	32,4	34,2	34,3	33,6
	CV (%)	1,81%	2,07%	1,23%	2,93%	2,97%	2,58%	4,16%
3	Ct	31,8	32,9	34,6	33,5	34,6	34,7	34,3
	CV (%)	3,68%	1,53%	1,84%	3,38%	2,90%	2,75%	3,55%
4	Ct	27,0	28,1	28,2	27,2	28,6	28,6	28,1
	CV (%)	0,78%	1,02%	0,93%	2,20%	2,87%	2,21%	3,74%
5	Ct	28,3	29,4	29,4	27,7	29,1	29,0	28,6
	CV (%)	0,83%	0,72%	0,91%	1,64%	2,75%	1,91%	3,59%

13.2.4 Réactivité analytique

La réactivité du test RIDA®UNITY Parasitic Stool Panel II multiplex real-time PCR a été examinée sur un panel défini de parasites (voir tableau 23).

Tableau 23 : Test de la réactivité analytique

Souche	Résultat*		
	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
<i>Giardia lamblia</i> **	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** Portland 1	+	-	-
<i>Giardia intestinalis</i> ** WB Clone C6	+	-	-
<i>Entamoeba histolytica</i>	-	+	-
<i>Cryptosporidium parvum</i> (isolat)	-	-	+
<i>Cryptosporidium parvum</i> (ADN artificiel)	-	-	+
<i>Cryptosporidium muris</i>	-	-	+
<i>Cryptosporidium hominis</i>	-	-	+

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

- = négatif










** *Giardia intestinalis* et *Giardia lamblia* sont le même organisme.

14. Historique des versions





Numéro de version	Section et désignation
2022-09-13	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. Escobedo AA, Hanevik K, Almirall P, Cimerman S, Alfonso M. Management of chronic *Giardia* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(9):1143-57.
2. Dixon B. *Giardia duodenalis* in humans and animals - Transmission and disease. 2020.
3. Bialek R, Dostal G. Parasitosen, Mykosen, Tropen- und Reisemedizin. *Pädiatrie.* 2019:371-99. German. doi: 10.1007/978-3-662-57295-5_16. PMID: PMC7498386.
4. Khan A, Shaik JS, Grigg ME. Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* 2018;184:1-14.
5. Dong S, Yang Y, Wang Y, Yang D, Yang Y, Shi Y, et al. Prevalence of *Cryptosporidium* Infection in the Global Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitol.* 2020;65(4):882-9.
6. T. Löscher und G.D. Burchard (Hrsg.): *Tropenmedizin in Klinik und Praxis mit Reise- und Migrationsmedizin.* 4. Aufl., Thieme, Stuttgart; New York, 2010, S. 655-659.
7. Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (Hrsg.): *DGPI Handbuch. Infektionen bei Kindern und Jugendlichen.* 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 2013
8. Salami A, Fakh H, Chakkour M, Salloum L, Bahmad HF, Ghsein G. Prevalence, risk factors and seasonal variations of different Enteropathogens in Lebanese hospitalized children with acute gastroenteritis. *BMC Pediatr.* 2019;19(1):137.
9. Custodio H. Protozoan Parasites. *Pediatr Rev.* 2016;37(2):59-69; quiz 70-1.