



BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology

REF 3150046_SEC01 / 3150046_SEC02 / 3150046_BLK96

FR (FRANÇAIS / FRENCH)	1
EN (ENGLISH)	26

CONTENTS

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology

PCR POUR LA DÉTECTION QUALITATIVE DES BACTÉRIES GASTRO-INTESTINALES DANS LES ÉCHANTILLONS DE SELLES.

Dispositif médical de diagnostic *in vitro* réservé à un usage professionnel.

REF 3150046_SEC01 / 3150046_SEC02 / 3150046_BLK96

1. DESTINATION

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* pour la détection qualitative de 15 agents pathogènes communément associés à la gastro-entérite : *Campylobacter spp*, *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella spp*, *Clostridioides difficile*, souches hypervirulentes de *Clostridioides difficile*, *Aeromonas spp*, toxine de choléra, *Vibrio spp*, souche *Escherichia coli* O157, *Escherichia coli* entéroinvasif (EIEC)/*Shigella spp*, *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC), *Escherichia coli* entéroagrégant (EAEC), *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) et *Plesiomonas shigelloides*.

Le test est une aide au diagnostic de la gastro-entérite bactérienne réalisée à l'aide d'un extrait d'ADN purifié obtenu à partir d'échantillons de selles prélevés avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment ou avec FecalSwab™ (Copan). Pour un diagnostic syndromique, la PCR peut être réalisée simultanément avec le test BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology (réf. 3150047 et références associées) en utilisant les mêmes échantillons et le même programme d'amplification. Ce test non automatisé est destiné au diagnostic *in vitro* en laboratoire par des professionnels uniquement.

2. RÉSUMÉ CLINIQUE

La gastro-entérite est une inflammation du tractus gastro-intestinal qui provoque des diarrhées, des douleurs abdominales, des nausées, de la fièvre et parfois des vomissements. Cette inflammation touche près de 1,7 milliard d'enfants chaque année et constitue l'une des principales causes de décès chez les enfants de moins de cinq ans, principalement en raison d'une déshydratation sévère (Organisation mondiale de la santé). Elle peut être provoquée par de nombreux agents infectieux différents tels que les parasites (10 à 15 %), les bactéries (15 à 20 %) et les virus (50 à 70 %) qui se propagent par voie fécale-orale à travers la contamination des aliments et de l'eau.¹

Les symptômes de la maladie apparaissent généralement 6 heures à 5 jours après l'infection et peuvent durer de 2 à 7 jours. La diarrhée est le symptôme clinique le plus courant des infections gastro-intestinales. D'autres symptômes peuvent apparaître en même temps que la diarrhée, comme des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, une diarrhée hémorragique (dans le cas d'une infection à EHEC, par exemple) et de la fièvre. Ces symptômes peuvent être graves et, en l'absence d'un diagnostic précis et rapide, ils peuvent avoir de graves conséquences, y compris la mort. Le diagnostic de cette maladie doit être effectué chez les patients souffrant de diarrhée aiguë et/ou de l'un des symptômes énumérés ci-dessus, afin de permettre l'administration d'un traitement spécifique aux patients atteints de gastro-entérite sévère, en particulier ceux dont les selles sont sanguinolentes, qui souffrent d'une maladie prolongée ou qui sont atteints d'une affection chronique.²

Les bactéries pathogènes les plus courantes qui déclenchent des infections gastro-intestinales sont *Salmonella spp*, *Yersinia spp*, *Campylobacter spp*, *Aeromonas spp*, *Clostridioides difficile*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio spp*, *Escherichia coli* et *Shigella spp*.

- La bactérie *Salmonella* reste une cause majeure de gastro-entérite aiguë, avec des épidémies notables en Europe (2017) et aux États-Unis (2020).^{3,4} Le genre *Salmonella*, qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, comprend deux espèces : *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*, qui sont toutes deux des bacilles à Gram négatif. *Salmonella enterica* est l'espèce la plus courante. Elle est divisée en six sous-espèces, comprenant plus de 2 500 sérotypes différents, dont les plus connus sont *Salmonella Typhimurium* et *Salmonella Enteritidis*.⁵

Salmonella bongori est une espèce distincte de *Salmonella*, moins fréquente que *Salmonella enterica*. Contrairement à *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* ne possède pas certains îlots de pathogénicité (SPI2), ce qui la rend moins fréquente que *Salmonella enterica*. *Salmonella* se transmet principalement par la consommation d'aliments contaminés, tels que la viande, les œufs, le lait cru et certains produits laitiers. Le contact direct avec des animaux infectés, en particulier les reptiles, peut également être une source de contamination.

- Le genre *Yersinia*, qui fait également partie de la famille des Enterobacteriaceae, comprend 11 espèces de bacilles à Gram négatif, dont trois pathogènes humains : *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis*. *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont associées à des infections gastro-intestinales, en particulier en hiver. *Yersinia* est l'une des principales causes de gastro-entérite, le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) faisant état de 7 048 cas de yersiniose en 2019.⁶ *Y. enterocolitica* est plus fréquente dans les climats plus froids et peut se développer à des températures de réfrigération, ce qui la rend préoccupante pour la sécurité alimentaire.⁷ *Y. pseudotuberculosis* provoque une maladie semblable à la tuberculose chez les animaux, d'où son nom ; les infections par *Y. pseudotuberculosis* sont moins fréquentes que celles causées par *Y. enterocolitica*. Les deux espèces partagent plusieurs facteurs de virulence, comme la capacité d'envahir les cellules intestinales et d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Ce sont tous deux des agents pathogènes zoonotiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent être transmis de l'animal à l'homme.
- Les infections à *Campylobacter* font partie des maladies infectieuses les plus répandues et ont augmenté dans les pays développés et en développement au cours de la dernière décennie.⁸ Selon l'OMS, *Campylobacter* est l'une des causes mondiales de maladies diarrhéiques.⁹ Le genre comprend plusieurs espèces à Gram négatif en forme de spirale, de courbe ou de bâtonnet. *C. jejuni* et *C. coli* sont les principales causes de gastro-entérite chez l'homme, tandis que des espèces comme *C. upsaliensis* et *C. fetus* sont des pathogènes émergents. Les principaux réservoirs sont les animaux, en particulier les oiseaux, les porcs et les animaux domestiques.
- Les espèces d'*Aeromonas* sont des agents pathogènes émergents qui provoquent diverses maladies humaines, notamment des septicémies, des infections de plaies et des gastro-entérites.^{10,11} On les trouve couramment dans les environnements aquatiques. L'incidence d'*Aeromonas* dans les gastro-entérites varie de 2 à 10 %, selon les pays. Le genre comprend 14 espèces à Gram négatif en forme de bâtonnet, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. dhakensis* et *A. hydrophila* étant les plus associées aux infections humaines. *A. caviae* est connue pour sa capacité à former des biofilms, ce qui peut favoriser sa survie dans divers environnements et contribuer à sa pathogénicité. *A. veronii* produit divers facteurs de virulence et constitue une cause importante de gastro-entérite, en particulier chez les enfants. *A. dhakensis* peut provoquer des infections graves chez l'homme et est considérée comme plus virulente qu'*A. hydrophila*, avec laquelle elle est souvent confondue. Les outils moléculaires sont essentiels pour une détection précise.¹¹ *A. hydrophila* est largement répandue dans les environnements d'eau douce et est connue pour sa capacité à survivre dans diverses conditions, y compris à basse température ; en outre, elle résiste à la chloration et peut persister dans l'eau contaminée.
- *Clostridioides difficile* est une bactérie à Gram positif, sporulée, qui peut provoquer des infections gastro-intestinales graves, en particulier après l'utilisation d'antibiotiques.¹² Sa virulence est principalement médiée par deux entérotoxines, TcdA et TcdB, qui détruisent le cytosquelette d'actine des cellules intestinales. La TcdB est considérée comme plus puissante et plus répandue que la TcdA, et elle est principalement responsable de l'effet cytotoxique observé dans les infections à *C. difficile*. De plus, il est possible de distinguer une souche hypervirulente qui sécrète plus de TcdA et de TcdB grâce à une délétion dans la séquence régulatrice de l'opéron. En plus de ces deux toxines, certaines souches produisent une troisième toxine, la toxine binaire *C. difficile transferase* (CDT), qui peut également contribuer à la virulence de l'agent pathogène et à la maladie. Il est intéressant de noter que certaines souches de *C. difficile*, telles que RT033 et RT442, ne possèdent pas les toxines TcdA/TcdB

classiques, produisent la toxine binaire, provoquent une gastro-entérite et passent le plus souvent inaperçues lors du diagnostic.¹³ *C. difficile* est responsable de plus de 453 000 cas de gastro-entérite aux États-Unis en 2011 et figure dans la catégorie la plus prioritaire des menaces de résistance aux antimicrobiens selon l'ECDC.¹⁴ Ces infections sont difficiles à traiter pour plusieurs raisons : spores hautement résistantes et à longue durée de vie ; résistance aux antibiotiques ; prolifération après perturbation du microbiote intestinal normal ; formation de biofilms et infections récurrentes. Lorsque le traitement antibiotique échoue, la transplantation de microbiote fécal est une approche alternative pour se débarrasser des infections récurrentes. Les probiotiques et l'immunothérapie sont également étudiés en tant que thérapies complémentaires pour améliorer l'efficacité du traitement et prévenir les récurrences.

- *Plesiomonas shigelloides* est une bactérie à Gram négatif, en forme de bâtonnet, qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Elle est répartie dans le monde entier, mais on la trouve principalement dans les zones tropicales, où elle habite surtout l'eau douce, en particulier pendant les mois les plus chauds.¹⁵ Elle est souvent associée à des animaux aquatiques comme les poissons, les crustacés et les amphibiens, mais aussi à certains animaux terrestres. *P. shigelloides* peut provoquer une gastro-entérite, entraînant souvent une diarrhée, surtout après avoir consommé de l'eau ou des fruits de mer contaminés.¹⁵
- Le genre *Vibrio* comprend des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet qui vivent naturellement dans les eaux douces et les milieux marins. Les espèces pathogènes les plus courantes sont *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. *V. cholerae* est à l'origine de maladies diarrhéiques graves, avec environ 3 à 5 millions d'infections par an dans le monde. L'espèce compte plus de 200 sérogroupes, le sérotype O1 étant le plus répandu.¹⁶ *V. parahaemolyticus* est omniprésente dans les zones côtières tempérées et tropicales et provoque environ 30 000 infections par an. *V. vulnificus* est un pathogène opportuniste qui affecte les patients atteints de maladies chroniques.¹⁷
- *Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif, en forme de bâtonnet, qui appartient à la famille des Enterobacteriaceae. Dès les premières heures suivant la naissance, elle colonise le tractus gastro-intestinal des nourrissons, devenant partie intégrante d'un microbiote normal et sain par le biais d'une relation commensale. Cependant, *E. coli* peut provoquer des maladies dans certaines conditions, notamment chez les hôtes immunodéprimés ou lorsque la barrière gastro-intestinale est rompue. Les *E. coli* pathogènes sont responsables d'environ 2 millions de décès par an, en particulier chez les enfants de moins de cinq ans. Chaque pathotype d'*E. coli* possède un mécanisme pathogène caractéristique et un profil spécifique de facteurs de virulence.¹⁸ Nous pouvons distinguer quatre grandes classes de virulence : la colonisation, l'aptitude, les toxines et les effecteurs, chacune d'entre elles étant constituée d'un facteur de virulence spécifique ayant une fonction et une activité définies. Sept pathotypes d'*E. coli* ont été identifiés, dont les cinq les plus associés à la gastro-entérite : entéro-agrégants (EAEC), entéro-invasifs (EIEC), *E. coli* sécrétant des shiga-toxines (STEC, y compris *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC), le sérotype O157 étant le plus courant dans les récentes épidémies européennes), entéro-pathogènes (EPEC) et entérotoxinogènes (ETEC). Ces pathotypes peuvent différer par leurs stratégies de colonisation et/ou d'invasion cellulaire ; en outre, ils se distinguent par la présence ou l'absence de divers gènes de virulence, tels que les toxines stx1/stx2 chez les EHEC.¹⁸ Ces gènes de virulence peuvent être codés par des plasmides ou dans des régions chromosomiques. Il est crucial de distinguer le pathotype d'*E. coli* dans le contexte de la gastro-entérite, car les différents pathotypes peuvent provoquer une variété de symptômes et nécessiter des approches thérapeutiques spécifiques. Certains pathotypes d'*E. coli*, tels que l'*E. coli* entérohémorragique (EHEC) ou l'*E. coli* entérotoxigène (ETEC), peuvent provoquer des symptômes allant de la diarrhée aqueuse à la diarrhée sanglante et aux crampes abdominales sévères. Par exemple, EHEC peut entraîner une colite hémorragique et des complications extra-intestinales graves telles que le syndrome hémolytique et urémique. En outre, la connaissance du pathotype permet d'identifier les sources potentielles de contamination et de mettre en œuvre des mesures préventives appropriées. Par exemple, les EHEC sont souvent associées à la consommation de viande insuffisamment cuite et de produits

laitiers non pasteurisés. Les traitements peuvent également varier en fonction du pathotype : par exemple, l'utilisation d'antibiotiques peut être contre-indiquée pour certains pathotypes tels que EHEC, car elle peut aggraver les symptômes. Enfin, elle présente également un intérêt épidémiologique, car la surveillance et le contrôle des épidémies nécessitent une identification précise du pathotype pour comprendre les modes de transmission et mettre en œuvre des interventions de santé publique efficaces.

- Les *Shigella* sont l'une des principales causes de mortalité due aux maladies diarrhéiques, avec 212 000 décès en 2016. Le genre *Shigella* comprend des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet qui sont génétiquement proches d'*E. coli*. Il existe quatre espèces de *Shigella* : *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, et *S. sonnei*.¹⁹ *Shigella* envahit les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, entraînant une inflammation sévère et la destruction des tissus. Elle produit également plusieurs toxines qui contribuent à sa pathogénicité. *Shigella* et EIEC sont si proches génétiquement qu'elles sont souvent considérées comme faisant partie du même pathovar au sein du genre *Escherichia* ; elles partagent également le même plasmide de virulence. Les *Shigella*, en particulier *S. flexneri*, ont tendance à provoquer une maladie plus grave avec une réponse inflammatoire prononcée par rapport aux EIEC. En France et dans les pays industrialisés, le sérotype le plus courant est *S. sonnei*, mais il est également en train d'émerger dans le monde entier, y compris dans les pays en développement. Dans le passé, *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (ou *Shiga bacillus*) était à l'origine d'épidémies meurtrières. Depuis 2011, plus aucune souche de ce sérotype n'a été signalée.

3. PRINCIPE DU TEST

Le test consiste en une PCR multiplex permettant l'amplification spécifique et la détection simultanée de gènes bactériens et/ou de toxines spécifiques des espèces *Campylobacter*, *Salmonella*, *Vibrio* et *Aeromonas*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, des gènes de la toxine cholérique, *Plesiomonas shigelloides*, 5 pathotypes différents d'*E. coli* EPEC, EAEC, ETEC, EHEC, EIEC et *Shigella spp.*, ainsi qu'une indication de la présence de la souche *E. coli* O157.

Le test est composé de 5 master mixes qui sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Master mixes	Canal	Pathogènes bactériens	Gènes/séquences cibles
A	FAM	<i>Campylobacter spp.</i>	16S (<i>C. jejuni/C. coli</i>) lpxA (<i>C. upsaliensis</i>) gyrB (<i>C. fetus</i>)
	HEX	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YST ail
	TxRed	<i>Salmonella spp.</i>	invA
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification	CIEZ
B	FAM	<i>Clostridioides difficile</i> Hypervirulent	tcdC ^{A117}
	HEX	ToxB/Toxine binaire <i>Clostridioides difficile</i>	tcdB, CDT
	TxRed	<i>Aeromonas spp.</i> (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. dhakensis</i> et <i>A. caviae</i>)	gyrB
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification	Séquence CIEZ
C	FAM	Toxines du choléra	ctxAB, tcpA
	HEX	<i>Vibrio spp.</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. Parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> et <i>V. fluvialis</i>)	ATPsynthase
	TxRed	Souche d' <i>E. coli</i> O157	z3276
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification	Séquence CIEZ
D	FAM	<i>Shigella spp./E. coli</i> EIEC	ipaH

	HEX	<i>E. coli</i> EPEC	<i>eaeA, bfp</i>
	TxRed	<i>E. coli</i> ETEC	<i>lt1/sta</i>
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification	Séquence CIEZ
E	FAM	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>HugA</i>
	HEX	<i>E. coli</i> EAEC	<i>aggR, aap</i>
	TxRed	<i>E. coli</i> EHEC	<i>stx1, stx2</i>
	Cy5	Contrôle procédural	Rp49

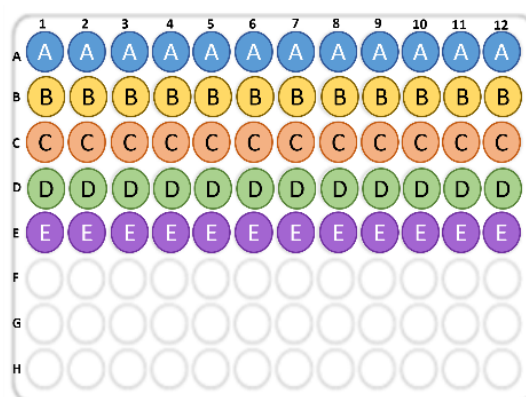
Un contrôle interne exogène CIEZ, ainsi qu'un contrôle procédural exogène Rp49 sont inclus : Le contrôle interne CIEZ est détecté dans le canal Cy5 des master mixes A, B, C et D, tandis que le contrôle procédural exogène Rp49 est détecté dans le canal Cy5 du master mix E.

Le test est basé sur la technologie de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) par hydrolyse d'une sonde fluorescente. Cette méthode utilise des sondes marquées avec FAM, HEX, Texas Red et Cy5 pour l'amplification des cibles bactériennes et des sondes marquées avec Cy5 pour la détection des séquences utilisées comme contrôles CIEZ et Rp49. Il convient de noter que la détection du contrôle interne CIEZ valide l'étape d'amplification de la PCR et exclut un éventuel résultat faussement négatif dû à l'inhibition de la PCR. Rp49 est une séquence d'ADN connue de la drosophile qui est absente des génomes humains et bactériens. Elle est donc ajoutée aux échantillons de selles en tant que contrôle d'extraction, également connu sous le nom de contrôle procédural. L'ajout de la séquence exogène Rp49 dans les échantillons fécaux et sa détection permettent de contrôler la qualité de l'échantillon biologique et de valider l'étape de purification du matériau génomique.

L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible est complémentaire de la sonde amplifiée présente dans l'échantillon. Le signal fluorescent est donc directement proportionnel à l'amplification de la cible pendant la phase d'amplification. La valeur C_q (cycle de quantification) correspond au nombre de cycles pendant lesquels la fluorescence augmente de manière exponentielle par rapport au bruit de fond.

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology est disponible en deux formats :

- Au format Bluk (réf. 3150046_BLK96) : chaque master mix est fourni dans un microtube pour que l'utilisateur puisse le distribuer dans des plaques PCR.
- En microplaques pré-remplies (réf. 3150046_SEC01 et 3150046_SEC02) : chaque master mix est distribué dans un puits de chaque barrette selon l'ordre indiqué ci-dessous.



Quel que soit leur conditionnement, les master mixes sont prêts à l'emploi et contiennent des dNTP, du MgCl₂, des amorces et des sondes fluorescentes, de l'enzyme Taq polymérase et du tampon de réaction.

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology doit être utilisé avec un échantillon de selles collecté et traité avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (réf. 3150065) ou collecté avec FecalSwab™

(Copan). Quel que soit le système de collecte utilisé, les acides nucléiques doivent être extraits et purifiés avant l'étape d'amplification.

4. MATERIEL REQUIS

3150046_SEC01 ou 3150046_SEC02	3150046_BLK96
Composition du kit	
<ul style="list-style-type: none"> - 5 microplaques de 96 puits divisibles pré-remplies avec les cinq master mixes (Mmix) - 1 tube de contrôle positif (CONTROL+, bouchon rouge) - 1 tube de contrôle négatif (CONTROL -, bouchon vert) - 1 tube de contrôle procédural (CONTROL IP, bouchon jaune) - 1 tube de master mix contrôle (CONTROL Mmix, bouchon bleu) - 5 sachets de barrettes de bouchons optiques 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 tube de master mix A (Mmix A, bouchon blanc marqué B1) - 1 tube de master mix B (Mmix B, bouchon blanc marqué B2) - 1 tube de master mix C (Mmix C, bouchon blanc marqué B3) - 1 tube de master mix D (Mmix D, bouchon blanc marqué B4) - 1 tube de master mix E (Mmix E, bouchon blanc marqué B5) - 1 tube de contrôle positif (CONTROL+, bouchon rouge) - 1 tube de contrôle négatif (CONTROL -, bouchon vert) - 2 tubes de contrôle procédural (CONTROL IP, bouchon jaune) - 1 tube de master mix contrôle (CONTROL Mmix, bouchon bleu)
Matériel requis, mais non fourni	
<ul style="list-style-type: none"> - BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) ou FecalSwab™ transport medium (Copan, ref. 470CE) - Kit d'extraction d'ADN - Gants jetables non poudrés - Pipettes et cônes à filtre - Microplaque PCR ou microtubes centrifugeuse - Thermocycleur qPCR 	<ul style="list-style-type: none"> - BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) ou FecalSwab™ transport medium (Copan, ref. 470CE) - Kit d'extraction d'ADN - Gants jetables non poudrés - Pipettes et cônes à filtre - Microplaque PCR ou microtubes avec bouchons optiques - Centrifugeuse à microplaque PCR ou microtubes - Thermocycleur qPCR

Le thermocycleur PCR utilisé pour le test doit présenter les principales caractéristiques suivantes :

- Système ouvert
- Tests PCR quantitatifs en temps réel
- Bloc thermocycleur programmable

Référence	Bloc thermocycleur
3150046_SEC01	0,1 ml low-profile
3150046_SEC02	0,2 ml high-profile

- Source d'excitation : LED, lampe ou laser
- Jeux de filtres (longueurs d'onde d'excitation/émission) adaptés à la détection des fluorophores « rapporteurs » des sondes FAM, HEX, TxRed et Cy5.
- Connexion à un ordinateur utilisant un logiciel d'analyse spécifique qui permet la récupération des données de fluorescence, les tests de quantification absolue et l'interprétation des résultats.

Le kit a été développé et validé avec les thermocycleurs PCR en temps réel suivants :

- Système de détection PCR en temps réel CFX96 Touch™ (BioRad)
- Système de détection PCR en temps réel CFX96 OPUS™ (BioRad)
- QuantGene 9600 (Bioer)
- Système QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

Si un autre thermocycleur est utilisé, veuillez effectuer votre propre validation du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology avant d'utiliser le test. Nous recommandons d'utiliser des échantillons qualifiés et les contrôles négatifs et positifs fournis dans le kit.

5. PRÉCAUTIONS

- Suivre attentivement cette notice d'utilisation. Le non-respect de l'une des instructions de cette notice d'utilisation peut nuire à la performance du test et avoir des conséquences néfastes.
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire et porter des gants de laboratoire jetables non poudrés tout au long de la procédure de test.
- La gestion quotidienne de nombreux échantillons et la grande sensibilité de la technique PCR peuvent, en l'absence de précaution, générer des résultats faussement positifs par contamination. Les opérations de pré-manipulation PCR, de post-manipulation PCR et d'extraction de l'ADN doivent donc être effectuées dans des pièces séparées. Porter des gants jetables dans chaque pièce et les changer avant de passer d'une pièce à l'autre.
- Les barrettes de bouchons fournies sont à usage unique. Ne pas les réutiliser. Ne pas ouvrir les tubes PCR ou les microplaques à la fin du test.
- Pour les kits pré-remplis (réf. 3150046_SEC01 et 3150046_SEC02) : Ne pas utiliser le test si le film aluminium est ouvert ou endommagé. Une fois le film aluminium retiré, utiliser le test immédiatement.
- Ne pas utiliser le kit s'il est reçu décongelé.
- Ne pas utiliser le kit en cas de casse ou de fuite. En cas de dommage à l'emballage uniquement (pas de casse ou de fuite), le kit reste utilisable.
- Protéger le kit de la lumière directe.
- Centrifuger les tubes avant de les ouvrir et les ouvrir l'un après l'autre, en les fermant hermétiquement entre chaque tube pour éviter toute contamination.
- Le contrôle positif (CONTROL +) contient des quantités significatives de séquences d'ADN. Il peut donc potentiellement contaminer les autres composants du kit si les bonnes pratiques de biologie moléculaire ne sont pas respectées. Pour limiter ce risque de contamination, il est recommandé de stocker le contrôle positif séparément des autres composants du kit, de préférence à l'extérieur du kit après la première utilisation.
- Les contrôles négatifs et positifs inclus dans le kit reproduisent les résultats obtenus avec des échantillons négatifs ou positifs respectivement. Ils doivent être utilisés à chaque test.
- Pour s'assurer qu'il n'y a pas de contamination lors de la manipulation, il appartient à l'utilisateur d'inclure dans sa démarche qualité interne, à la fréquence choisie, un puits de contrôle négatif supplémentaire dans lequel 5 µl d'eau de qualité biologie moléculaire sont ajoutés au master mix.
- Lors de l'utilisation de contrôles négatifs et positifs avec une série de patients, il est recommandé de déposer d'abord le contrôle négatif, puis les échantillons de patients, et de terminer par le dépôt du contrôle positif.
- Jeter les éléments souillées ou les composants vides du kit dans une poubelle adaptée aux déchets biologiques.
- Le dispositif contient du matériel d'origine bactérienne ou animale et doit être manipulé avec précaution.
- Si, en relation avec l'utilisation de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology, un décès ou une détérioration grave de la santé est survenu, il convient de le signaler au fabricant et à l'autorité compétente de votre pays. En cas de doute, le signaler.
- La fiche de données de sécurité est disponible sur demande. Un résumé de la sécurité et des performances sera disponible en ligne sur Eudamed.

6. CONSERVATION DU KIT

Le kit est expédié à l'état congelé. Les composants du kit doivent arriver congelés. Conserver le kit à une température inférieure ou égale à -20 °C. Dans ces conditions, les réactifs sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette du kit. Ne pas utiliser le kit ni aucun de ses composants après la date d'expiration. Protéger le kit et les réactifs de la lumière directe.

Les master mixes au format bulk (3150046_BLK96) et le master mix contrôle du kit peuvent subir 16 cycles de congélation/décongélation sans que la durée de conservation et les qualités du produit ne soient altérées. Les contrôles (y compris le contrôle procédural) du kit peuvent subir 30 cycles de congélation/décongélation sans que la durée de conservation et les qualités du produit ne soient altérées.

NB : Ne décongeler que le nombre de barrettes de puits ou de plaques nécessaires pour le format du kit pré-rempli. Les plaques et les barrettes étant prêtes à l'emploi, il n'est pas nécessaire d'effectuer des cycles répétés de décongélation/congélation.

7. RECUEIL ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

L'échantillon de selles doit être prélevé avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (réf. 3150065) ou avec FecalSwab™ (Copan) à partir de selles collectées dans un pot à prélèvement sans conservateur.

Pour la collecte et le stockage des échantillons, veuillez vous référer au mode d'emploi de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment ou du FecalSwab™ (Copan).

Éviter de répéter les cycles de congélation/décongélation des échantillons.

Le transport des échantillons cliniques doit respecter les réglementations locales relatives au transport des agents infectieux.

8. PROCÉDURE DU TEST

1. Préparation de l'échantillon :

Ajouter 5µL du contrôle procédural (control in process) (CONTROL IP, bouchon jaune) dans la préparation de l'échantillon (c'est-à-dire le tube FecalSwab™ ou BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment avec l'échantillon de selles).

2. Extraction d'acides nucléiques :

L'extraction des acides nucléiques doit être effectuée avant le protocole d'amplification à l'aide d'un système d'extraction approprié pour l'ADN bactérien. Veuillez suivre les instructions d'utilisation du fabricant.

Les contrôles positifs et négatifs fournis dans le kit ne doivent pas subir d'extraction et doivent être utilisés tels quels.

Le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology a été validé avec les kits d'extraction suivants :

- Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen (réf. 744215.4) avec le système automatisé MagnetaPure 32 (Dutscher)
- QIAGEN QIAampFAST DNA Stool Mini Kit (réf. 51604).

Si une autre méthode ou un autre kit d'extraction d'ADN est utilisé, veuillez effectuer votre propre méthode de validation du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology en utilisant des échantillons qualifiés positifs et négatifs complétés par le contrôle procédural de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology.

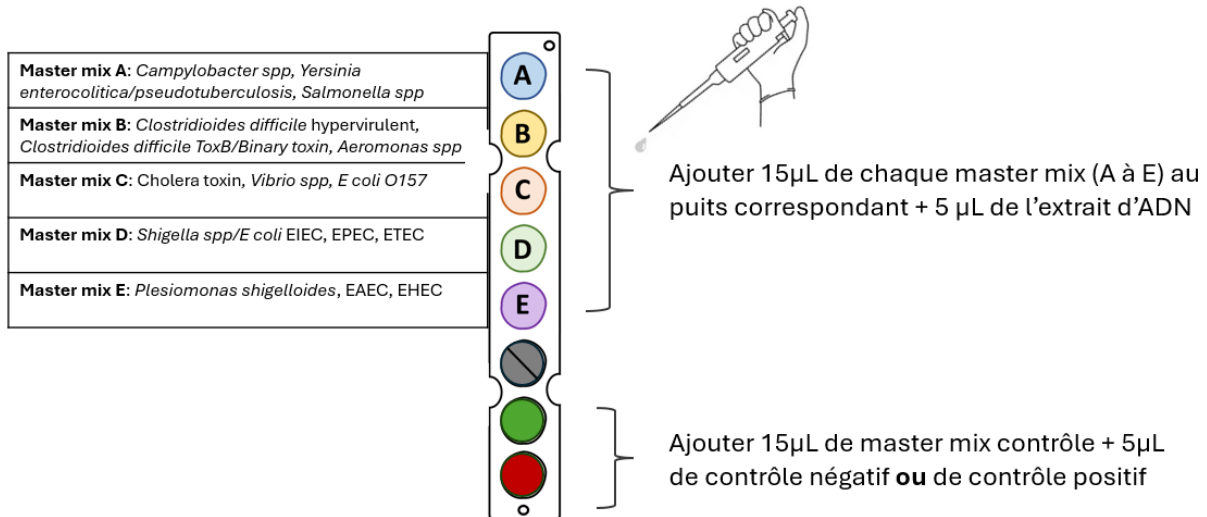
3. Protocole d'amplification :

Il est recommandé de placer les master mixes sur un support réfrigéré ou sur de la glace pendant l'ajout des échantillons.

Avec les microplaques pré-remplies de master mixes prêts à l'emploi (RÉF. 3150046_SEC01 et 3150046_SEC02) :

1. Sortir du congélateur le nombre de barrettes ou de plaques nécessaires.
2. Centrifuger pendant 10 secondes pour éliminer les gouttelettes des parois des puits ou du film de scellage en aluminium.

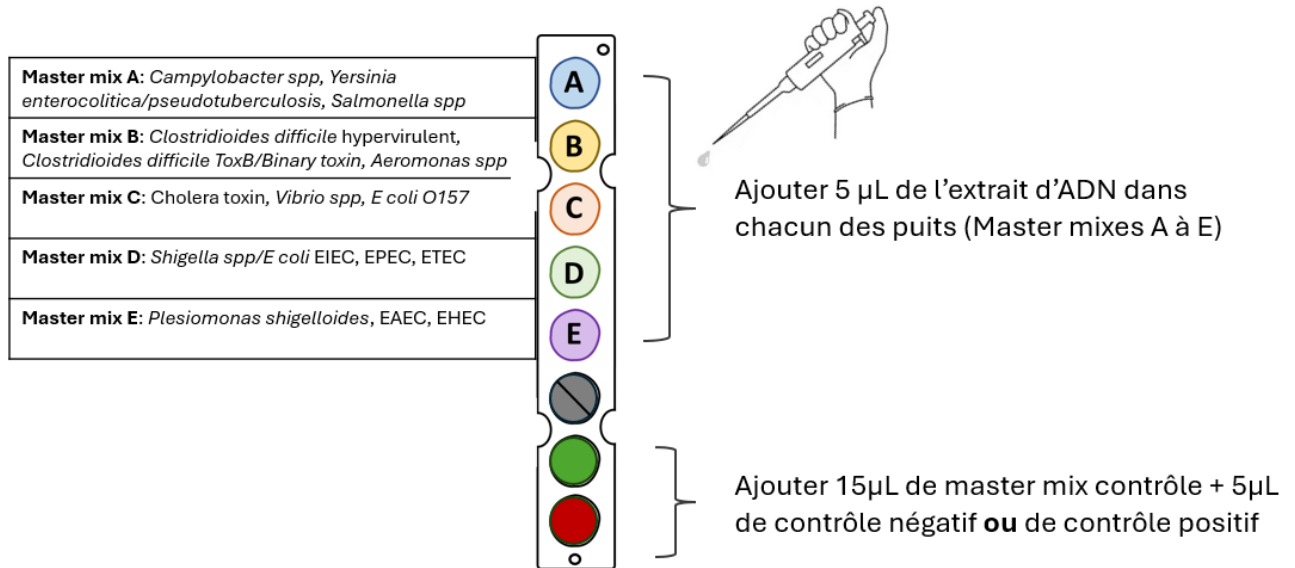
3. Ajouter 15µL de master mix de contrôle aux puits G et H d'une seule barrette. Si vous utilisez plusieurs barrettes en même temps, il n'est pas nécessaire de déposer le master mix de contrôle dans chaque barrette.
4. Ajouter 5 µl de contrôle négatif au puits G contenant le master mix contrôle ajouté à l'étape précédente.
5. Ajouter 5µL d'éluat d'extraction du même échantillon dans les puits contenant les master mixes (puits de la ligne A à la ligne E comme indiqué sur l'image ci-dessous).
6. Enfin, ajouter 5µL de contrôle positif dans le puits H contenant le master mix de contrôle ajouté à l'étape 4
7. Fermer la plaque ou les barrettes à l'aide des bouchons fournis et centrifuger à nouveau pendant 10 secondes pour éliminer les bulles potentielles à la surface.



Avec les tubes de master mixes au format bulk prêts à l'emploi (RÉF. 3150046_BLK96) :

1. Sortir les tubes de master mixes du congélateur et les laisser décongeler sur de la glace ou sur un support réfrigéré.
2. Centrifuger les tubes pendant 10 secondes pour éliminer toute gouttelette des parois ou des bouchons.
3. Distribuer 15 µl de chaque master mix dans les tubes PCR ou la plaque. Chaque master mix doit être déposé dans un puits séparé. Ainsi, pour chaque patient, 5 puits permettent un diagnostic sur l'ensemble du panel.
4. Distribuer 15 µl de master mix contrôle dans deux puits vides pour les contrôles.
5. Ajouter 5 µl de contrôle négatif à l'un des tubes/puits contenant le master mix de contrôle ajouté à l'étape précédente.
6. Ajouter 5 µl d'éluat d'extraction du même échantillon dans les puits de réaction dédiés (master mixes A à E).
7. Enfin, ajouter 5 µL de contrôle positif dans le dernier tube/puits contenant le master mix de contrôle ajouté à l'étape 4.
8. Fermer les puits avec des bouchons ou du film optiques.
9. Centrifuger pendant 10 secondes.
10. Remettre les tubes de master mix au congélateur.

N.B. Pour limiter la perte de réactif, il est important de pipeter le master mix sans plonger complètement la pointe dans le volume de master mix. Vous pouvez également utiliser les pointes « à faible rétention » ou « low-binding » pour limiter les pertes de réactifs.



Placer la plaque, les barrettes ou les tubes dans le thermocycleur et exécuter le programme d'amplification suivant :

Étape	Répétitions	Température	Durée	Acquisition
Transcription inverse	1x	45°C	15 min	-
Activation Taq	1x	95°C	2 min	-
Dénaturation	50x	95°C	5 sec	-
Hybridation / Élongation		60°C	20 sec	Oui

Si vous utilisez les systèmes de détection PCR en temps réel :

- CFX96 Touch™ (BioRad)
- CFX96 OPUS™ (BioRad)

Pour analyser les données d'amplification, veuillez sélectionner **Appliquer la correction de la dérive de fluorescence**.

Entrer 20 µl comme volume de réaction dans le programme du thermocycleur.

Merci de vous référer aux instructions d'utilisation du thermocycleur utilisé pour les informations de programmation.

Si un diagnostic syndromique est effectué en utilisant simultanément le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology, pour la procédure détaillée du test du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology, veuillez-vous référer à la notice d'utilisation du kit.

Paramètres des canaux de détection :

Master mixes	Canal	Cible/gènes bactériens
A	FAM	<i>Campylobacter spp.</i>
	HEX	<i>Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis</i>
	TxRed	<i>Salmonella spp.</i>
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification
B	FAM	<i>Clostridioides difficile</i> Hypervirulent
	HEX	ToxB/Toxine binaire <i>Clostridioides difficile</i>
	TxRed	<i>Aeromonas spp.</i> (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. dhakensis</i> et <i>A. caviae</i>)
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification
C	FAM	Toxines du choléra
	HEX	<i>Vibrio spp.</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>)
	TxRed	Souche d' <i>E. coli</i> O157
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification
D	FAM	<i>Shigella spp.</i> / EIEC
	HEX	EPEC
	TxRed	ETEC
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification
E	FAM	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
	HEX	EAEC
	TxRed	EHEC
	Cy5	Contrôle procédural

9. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le seuil de la réaction PCR en temps réel correspond au niveau de signal qui reflète une augmentation statistiquement significative de l'émission de fluorescence par rapport au signal de base calculé ; la valeur est fixée de manière à distinguer un signal d'amplification significatif du bruit de fond. Nous recommandons un réglage automatique du seuil par le logiciel de l'instrument PCR en temps réel, plutôt qu'un réglage manuel. Si d'autres réglages doivent être effectués pour le test, veuillez contacter l'équipe d'assistance technique du fabricant du thermocycleur.

Échantillons :

Les signaux supérieurs au seuil **et correspondant visuellement à une courbe d'amplification PCR classique** sont considérés comme des résultats positifs. Veuillez prendre en considération les courbes d'amplification du contrôle positif du kit comme référence.

Certains échantillons peuvent présenter des courbes atypiques qui ne sont pas caractéristiques des courbes d'amplification. Dans ce cas, le résultat ne doit pas être considéré comme interprétable et l'analyse de l'échantillon doit être répétée dans un nouveau test PCR comprenant des contrôles positifs et négatifs. Des valeurs limites de Cq (« Cq cut-off ») doivent également être prises en compte lors de l'interprétation des résultats.

Les interprétations des résultats et les valeurs limites de Cq sont données par cible/canal dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons peuvent être positifs pour un ou plusieurs agents pathogènes détectés dans le même puits ou dans des puits différents.

Contrôle qualité

Contrôle interne

Le contrôle interne CIEZ permet de s'assurer que les enzymes du master mix sont fonctionnelles. En effet, une courbe d'amplification doit être observée dans le canal Cy5 des master mixes A, B, C et D.

La valeur du contrôle interne doit être détectée préférentiellement avant 35 cycles ($Cq \leq 35$). Néanmoins, 2 situations d'absence d'amplification du contrôle interne peuvent être observées :

- Si les gènes cibles sont initialement présents dans l'échantillon avec un nombre élevé de copies, le contrôle interne peut ne pas être amplifié. Ce résultat est cohérent et n'invalide pas le test. Il doit être interprété comme un résultat positif malgré l'absence de signal du contrôle interne. Ce phénomène est le résultat d'une compétition d'amplification entre le contrôle interne et les cibles qui sont présentes en grand nombre de copies.
- Si les gènes cibles dans les canaux FAM, HEX et Texas Red ne sont pas amplifiés, ainsi que le contrôle interne dans le canal Cy5, aucun résultat ne peut être rendu. Cette situation met en évidence la présence d'inhibiteurs de PCR ou un problème technique survenant lors de la réalisation du test. La PCR doit être répétée :
 - après dilution de l'extrait d'ADN obtenu à 1/10
 - ou après avoir réalisé une nouvelle extraction/purification des acides nucléiques.

Contrôle procédural (CONTROL IP, bouchon jaune)

Le contrôle procédural exogène Rp49 doit être détecté dans le canal Cy5 du master mix E. Ce contrôle procédural valide la qualité du prélèvement de l'échantillon biologique et valide les étapes d'extraction et de purification de l'ADN.

En l'absence de signal d'amplification pour le contrôle procédural, le test est considéré comme non valide lorsqu'aucune cible n'a été détectée. Dans ce cas, l'extraction des acides nucléiques ou le traitement de l'échantillon doit être répété.

Contrôle négatif (CONTROL -, bouchon vert)

La fluorescence émise doit être inférieure au seuil, sauf pour le canal Cy5. Il s'agit d'un indicateur d'amplification non spécifique. Si la fluorescence est supérieure au seuil, vérifiez la présence d'une courbe atypique. Dans le cas d'une courbe d'amplification, une contamination ou une erreur de distribution dans les microtubes doit être envisagée.

Contrôle positif (CONTROL +, bouchon rouge)

La valeur du contrôle positif doit de préférence être détectée avant 30 cycles ($Cq \leq 30$) dans les quatre canaux (FAM, HEX, TxRed et Cy5). En l'absence d'amplification du contrôle positif, l'existence d'un problème d'amplification peut être suggérée. Certains échantillons présentent des courbes atypiques qui ne sont pas caractéristiques des courbes d'amplification sigmoïde. Dans ce cas, le résultat ne doit pas être considéré comme interprétable et l'échantillon doit être analysé à nouveau.

Master mix A				Interprétation de l'échantillon
<i>Campylobacter</i> spp (16S/lpxA/gyrB)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (yst) / <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (ail)	<i>Salmonella</i> spp (invA)	Contrôle interne (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+ Cq<40	-	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour les espèces <i>Campylobacter</i> (<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. upsaliensis</i> , <i>C. fetus</i>)
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>pseudotuberculosis</i>
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positif pour les espèces <i>Salmonella</i>
-	-	-	+ Cq ≤ 35	Négatif pour les pathogènes testés

Master mix B				Interprétation de l'échantillon
<i>C. difficile</i> Hypervirulent (<i>TcdC^{A117}</i>)	<i>C. difficile</i> (<i>TcdB/CDT</i>)	<i>Aeromonas spp</i> (<i>gyrB</i>)	Contrôle interne (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour la souche hypervirulante <i>Clostridioides difficile</i>
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour la toxine B ou la toxine binaire de <i>Clostridioides difficile</i>
-	-	+ Cq<41	+/- Cq ≤ 35	Positif pour les espèces <i>Aeromonas</i> (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. dhakensis</i>)
+/-	-	-	+ Cq ≤ 35	Négatif pour les pathogènes testés

Master mix C				Interprétation de l'échantillon
Toxines du choléra (<i>ctxAB/TcpA</i>)	<i>Vibrio spp</i> (<i>ATPsynthase</i>)	Souche d' <i>E. coli</i> O157 (<i>z3276</i>)	Contrôle interne (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>Vibrio cholerae</i> avec les gènes de la toxine du choléra
-	+ Cq<40	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour les espèces de <i>Vibrio</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. alginolyticus</i>)
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positif pour la souche <i>E. coli</i> O157
+/-	-	-	+ Cq ≤ 35	Négatif pour les pathogènes testés

Master mix D				Interprétation de l'échantillon
<i>E. coli</i> EIEC/ <i>Shigella spp</i> (<i>ipaH</i>)	<i>E. coli</i> EPEC (<i>bfp/eahA</i>)	<i>E. coli</i> ETEC (<i>lt1/sta</i>)	Contrôle interne (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+ Cq<40	-	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>E. coli</i> EIEC ou les espèces <i>Shigella</i> (<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i>)
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>E. coli</i> EPEC
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>E. coli</i> ETEC
-	-	-	+ Cq ≤ 35	Négatif pour les pathogènes testés

Master mix E				Interprétation de l'échantillon
<i>Plesiomonas shigelloides</i> (<i>HugA</i>)	<i>E. coli</i> EAEC (<i>aggR/aap</i>)	<i>E. coli</i> EHEC (<i>stx1/stx2</i>)	Contrôle procédural (Rp49)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	-	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>Plesiomonas shigelloides</i>
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>E. coli</i> EAEC
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positif pour <i>E. coli</i> EHEC
-	-	-	+ Cq ≤ 35	Négatif pour les pathogènes testés

Comme les pathotypes *E. coli* sont détectés dans différents puits, l'interprétation des résultats des puits C, D et E est nécessaire. Le tableau ci-dessous est une aide pour une interprétation rapide.

Master mix C			Master mix D			Master mix E			Interprétation de l'échantillon
Toxines du choléra (ctxAB/TcpA)	<i>Vibrio spp</i> (ATPsynthase)	Souche d' <i>E. coli</i> O157 (z3276)	<i>E. coli</i> EIEC / <i>Shigella spp</i> (ipaH)	<i>E. coli</i> EPEC (bfp/eaecA)	<i>E. coli</i> ETEC (lt1/sta)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (HugA)	<i>E. coli</i> EAEC (aggR/aap)	<i>E. coli</i> EHEC (stx1/stx2)	
FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	
-	-	-	+	-	-	-	-	-	EIEC et/ou <i>Shigella spp</i> (<i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i>)
-	-	-	+	-	-	-	-	+	<i>Shigella dysenteriae</i> / <i>Shigella flexneri</i> ou co-infection EIEC et EHEC ou <i>Shigella spp</i> et EHEC
-	-	-	-	-	-	-	+	-	EAEC typique ou atypique
-	-	-	-	-	+	-	-	-	ETEC
-	-	-	-	+	-	-	-	-	EPEC
-	-	-	-	-	-	-	-	+	EHEC
-	-	+	-	-	-	-	-	+	Souche EHEC O157
-	-	-	-	+	-	-	-	+	STEC (EHEC) ou co-infection EPEC et EHEC
-	-	+	-	+	-	-	-	+	STEC (EHEC O157) ou co-infection EPEC et souche EHEC O157
-	-	+	-	-	-	-	-	-	Négatif*

*Le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology peut détecter le sérotype O157 d'*E. coli* EHEC qui est responsable des principales épidémies. La virulence du pathotype EHEC est médiée par la sécrétion de shigatoxines (stx1/stx2). Plusieurs études ont mis en évidence la présence de souches *E. coli* O157 non pathogènes dans les matières fécales. Ces souches O157 non pathogènes ne sont pas porteuses des gènes stx1/stx2 et ne sont pas associées à la gastro-entérite.^{20,21} Par conséquent, une détection positive d'*E. coli* O157 doit être interprétée comme un résultat négatif en cas de détection négative de EHEC (stx1/stx2). Les résultats de la caractérisation de O157 doivent être interprétés lorsque seul EHEC est positif.

10. PERFORMANCES

Sensibilité analytique

Limites de détection des séquences cibles :

La limite de détection du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology est définie comme la concentration, en nombre de copies/μL, qui peut être détectée à 95 % dans un échantillon d'ADN spécifique à chaque cible. Elle a été déterminée en effectuant des dilutions en série d'échantillons de référence avec un nombre connu de copies.

Les LoD₉₅ de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology sur les échantillons d'ADN ont été statistiquement déterminés pour chaque pathogène et chaque gène ciblé. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Cible	Souches testées	LoD ₉₅ (copie d'ADN/μL CFU/μL)	LoD ₉₅ (copie d'ADN/rxn CFU/rxn)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Vircell MBC088-R	0,579	2,895
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC RM 2228	0,245	1,225
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC RM 3195	1,264	6,32
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC NCTC 10842	1,978	9,89
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vircell MBC027	2,221	11,105
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC NCTC 2476	1,167	5,835
<i>Salmonella typhimurium</i>	Vircell MBC044	3,894	19,47
<i>Salmonella enteritidis</i>	Vircell MBC003	3,076	15,38
<i>Clostridium difficile</i> souche 4118 (détection hypervirulente)	ATCC 4118	1,092	5,46
<i>Clostridium difficile</i> souche 4118 (détection de toxines)	ATCC 4118	0,432	2,16
<i>Clostridium difficile</i>	Vircell MBC043	3,607	18,035
<i>Aeromonas veronii</i>	DSMZ 7386	2,562	12,81
<i>Aeromonas dhakensis</i>	DSMZ 18362	4,372	21,86

<i>Aeromonas hydrophilia</i>	DSMZ 30187	2,523	12,615
<i>Aeromonas caviae</i>	DSMZ 7323	1,122	5,61
<i>Vibro cholerae</i> (détection de la toxine du choléra)	Vircell MBC118	3,416	17,08
<i>Vibro cholerae</i> (détection de <i>Vibrio spp</i>)	Vircell MBC118	4,345	21,725
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC EB101	2,981	14,905
<i>Vibrio vulnificus</i>	DSMZ 10143	3,328	16,64
<i>E. coli</i> VTEC (détection du sérotype O157)	Vircell MBC022	3,570	17,85
<i>E. coli</i> EIEC	Vircell MBC122	2,461	12,305
<i>Shigella flexneri</i>	DSMZ 4782	0,811	4,055
<i>E. coli</i> EPEC	Vircell MBC123	0,722	3,61
<i>E. coli</i> ETEC	Vircell MBC124	5,428	27,14
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC GNI14	9,221	46,105
<i>E. coli</i> EAEC	Vircell MBC121	2,225	11,125
<i>E. coli</i> VTEC (détection EHEC stx1/stx2 master mix E/TxRed)	Vircell MBC022	1,820	9,10

Spécificité analytique

Le modèle des oligonucléotides a été validée *in silico* par alignement BLAST. La comparaison des séquences d'amorces et de sondes montre que le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology est spécifique pour la détection des cibles spécifiées.

Réactivité croisée

Un panel de 42 échantillons d'ARN et 72 échantillons d'ADN provenant d'une biobanque répertoriée dans les tableaux suivants a été testé avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology. Pour tous ces échantillons, aucune amplification des cibles dans les différents master mixes n'a été observée.

ARN		
Astrovirus	Para-influenza humain de type 1	Para-influenza de type 3
Virus du chikungunya	Influenza A H1	Para-influenza 4 A
Coronavirus	Virus de la grippe A H3	Virus respiratoire syncytial (sous-type A)
Coronavirus Oc43	Virus de la grippe A H5	Virus respiratoire syncytial (sous-type B)
Coronavirus SARS	Grippe B	Rhinovirus
Coxsackie de type A6	Rougeole	Rotavirus
Coxsackie de type B1	Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient ou MERS-CoV	Rubella
Coxsackie de type B5	Oreillons	Sapovirus
Dengue 1	Norovirus	SARS-CoV-2
Dengue 2	Norovirus G1	Virus de l'encéphalite à tiques
Dengue 3	Norovirus G2	Virus du Nil occidental
Dengue 4	Nouvelle grippe A H1N1	Virus de la fièvre jaune
Echovirus 5	Para-influenza de type 1	Virus Zika
Entérovirus 68	Para-influenza de type 2	Virus Zika (lignée asiatique)

ADN		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
Adénovirus	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Adénovirus type 02	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
Adénovirus type 04	Cytomégalovirus	<i>Mycoplasma genitalium</i>
Adénovirus type 11	<i>Enterococcus faecalis</i> (vanB)	<i>Mycoplasma hominis</i>
Adénovirus type 20	<i>Enterococcus faecium</i> (vanA)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Adénovirus type 31	Virus d'Epstein-barr	<i>Neisseria meningitidis</i> sg A
Adénovirus type 40	<i>Francisella tularensis</i>	Papillomavirus type 16
Adénovirus 41	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Papillomavirus type 18
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Parvovirus b19</i> (plasmide)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (mecA-)
Virus BK	Herpès simplex 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (mecA+)

<i>Bordetella holmesii</i>	Herpès simplex 2	Streptococcus pneumoniae
<i>Borrelia afzelii</i>	HHV-6	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	HHV-8	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1)	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Virus varicelle-zona
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	-
<i>Clostridioides difficile</i> ribotype 010	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	-

Réactivité analytique

La réactivité analytique du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology a été confirmée en testant un panel de 51 ADN de différentes souches bactériennes ciblées par ce kit. Les résultats figurent à l'annexe 1.

Interférence chimique

Diverses substances pouvant être présentes dans les échantillons de selles des patients peuvent provoquer des interférences positives ou négatives sur les résultats de la PCR. Les tests d'interférence sur le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology ont été réalisés en ajoutant l'interfèrent potentiel aux échantillons positifs de l'écouvillon fécal et testés sur le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology :

Substances testées	Concentration testée	Interférence observée
Bétaméthasone	2,5 % v/v	Aucune
Crème pour hémorroïdes (crème Titanoréine)	0,25% v/v	
Mucine	0,8 % p/v	
Imodium (Lopéramide-Lyoc)	5% p/v	
Ampicilline sel de sodium	152 µmol/L	
Supplément d'acides gras	4,8%	
Pepto-Bismol	5%	
Amidon	1,5% p/v	
Cellulose	4% p/v	
Pectine	0,01% p/v	
Lubrifiant	5% v/v	
Éthanol	0,2% v/v	
Urine	20% v/v	
Sang	40% v/v	

Données de précision

Les données de précision pour le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology ont été déterminées sur la base de 5 conditions :

- Variation intra-essai (au sein d'un seul test - répétabilité)
- Variation inter-jours (entre différents tests)
- Variation inter-opérateurs (entre différents opérateurs)
- Variation inter-laboratoires (entre différents sites)
- Variation inter-lots (entre différents lots)

Les données de précision sont exprimées en termes de valeur moyenne Cq, d'écart-type (SD) et de coefficient de variation (CV), sur la base des valeurs seuils du cycle de quantification (Cq) pour l'ADN des différentes cibles. Les données de variabilité intra-essai pour le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology ont été déterminées sur 30 tests répétés utilisant des échantillons bactériens négatifs et positifs pour chaque cible virale. Les déterminations SD et CV ont montré que le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology est reproductible avec un CV < 5%. Les variabilités inter-jours, inter-

opérateurs, inter-laboratoires et inter-lots ont été déterminées sur des tests en duplicat à partir d'ADN bactérien extrait. Les résultats de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology sont reproductibles avec un CV < 5%.

La variabilité par cible est indiquée dans les tableaux ci-dessous :

Variabilité <i>C. jejuni</i>	Master mix A / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	24,71	0,09	0,37%	36,47	0,98	2,70%
Inter-jours	19,77	0,50	2,51%	36,10	0,85	2,35
Inter-opérateurs	19,43	0,57	2,93%	35,53	0,55	1,54
Inter-laboratoires	19,85	0,77	3,87%	36,13	1,43	3,95%
Inter-lots	19,93	0,06	0,3%	35,31	0,18	0,5%

Variabilité <i>C. fetus</i>	Master mix A / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	24,31	0,08	0,33%	33,85	0,22	0,64%
Inter-jours	20,28	0,35	1,72%	36,53	0,84	2,30%
Inter-opérateurs	20,42	0,34	1,64%	36,98	0,17	0,45%
Inter-laboratoires	20,46	0,31	1,54%	35,46	0,20	0,57%
Inter-lots	20,34	0,35	1,72%	36,03	0,63	1,76%

Variabilité <i>C. upsaliensis</i>	Master mix A / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	24,17	0,11	0,46%	34,55	0,31	0,89%
Inter-jours	19,75	0,28	1,41%	35,73	0,52	1,44%
Inter-opérateurs	19,75	0,18	0,91%	36,34	0,35	0,95%
Inter-laboratoires	19,33	0,12	0,60%	35,20	1,32	3,75%
Inter-lots	20,59	0,80	3,88%	35,70	0,35	0,98%

Variabilité de <i>Y. enterocolitica</i>	Master mix A / HEX					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	26,38	0,06	0,21%	35,78	0,64	1,79%
Inter-jours	20,43	0,41	2,03%	35,58	0,33	0,94%
Inter-opérateurs	20,28	0,25	1,22%	35,75	0,31	0,86%
Inter-laboratoires	20,85	0,33	1,59%	35,58	0,28	0,79%
Inter-lots	20,24	0,52	2,59%	35,03	0,26	0,75%

Variabilité de <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Master mix A / HEX					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	23,57	0,06	0,26%	34,51	0,90	2,61%
Inter-jours	18,82	0,41	2,19%	35,21	0,20	0,56%
Inter-opérateurs	18,82	0,11	0,60%	35,09	0,10	0,27%
Inter-laboratoires	19,17	0,51	2,64%	35,54	0,01	0,02%
Inter-lots	18,45	0,23	1,23%	35,13	0,00	0,01%

Variabilité de <i>S. enteritidis</i>	Master mix A / Texas Red					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	27,31	0,08	0,30%	35,98	0,47	1,31%
Inter-jours	19,91	0,72	3,60%	35,94	0,89	2,47%
Inter-opérateurs	19,54	0,59	3,02%	36,55	0,28	0,77%
Inter-laboratoires	20,30	0,16	0,78%	36,14	0,11	0,31%
Inter-lots	19,95	0,6	3,03%	35,28	0,65	1,85%

Variabilité de <i>C. difficile</i> hypervirulent	Master mix B / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	25,24	0,06	0,22%	34,17	0,59	1,74%
Inter-jours	19,43	0,54	2,76%	35,37	0,28	0,79%
Inter-opérateurs	19,10	0,56	2,93%	35,47	0,20	0,56%
Inter-laboratoires	19,62	0,82	4,16%	34,77	1,24	3,56%
Inter-lots	19,57	0,12	0,60%	35,01	0,14	0,39%

Variabilité des toxines de <i>C. difficile</i>	Master mix B / HEX					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	25,47	0,07	0,29%	34,89	0,50	1,44%
Inter-jours	19,79	0,40	2,04%	35,51	0,45	1,28%
Inter-opérateurs	19,64	0,29	1,46%	35,28	0,25	0,71%
Inter-laboratoires	20,22	0,23	1,14%	36,55	0,74	2,02%
Inter-lots	19,84	0,24	1,23%	34,84	0,35	0,99%

Variabilité de <i>A. veronii</i>	Master mix B / Texas Red					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	25,78	0,06	0,22%	34,86	0,37	1,07%
Inter-jours	20,29	0,57	2,81%	36,72	0,97	2,63%
Inter-opérateurs	19,96	0,55	2,76%	36,81	1,40	3,79%
Inter-laboratoires	20,81	0,05	0,25%	36,79	0,27	0,74%
Inter-lots	20,44	0,64	3,11%	35,79	0,20	0,55%

Variabilité de la toxine du choléra	Master mix C / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	27,24	0,09	0,34%	36,34	0,88	2,41%
Inter-jours	20,15	0,54	2,70%	36,54	0,74	2,03%
Inter-opérateurs	19,78	0,65	3,27%	36,20	0,71	1,96%
Inter-laboratoires	20,29	0,77	3,78%	36,10	0,72	2,01%
Inter-lots	20,18	0,05	0,25%	36,20	0,41	1,14%

Variabilité de <i>Vibrio spp.</i>	Master mix C / HEX					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	27,21	0,08	0,30%	35,58	0,85	2,38%
Inter-jours	20,36	0,38	1,84%	35,62	0,64	1,80%
Inter-opérateurs	20,22	0,25	1,24%	36,39	1,01	2,77%
Inter-laboratoires	20,76	0,25	1,21%	36,25	1,52	4,20%

Inter-lots	20,34	0,28	1,39%	35,36	0,42	1,19%
------------	-------	------	-------	-------	------	-------

Variabilité de EHEC O157	Master mix C / Texas Red					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	28,00	0,07	0,23%	35,23	0,42	1,19%
Inter-jours	21,40	0,63	2,94%	37,62	0,47	1,26%
Inter-opérateurs	21,10	0,68	3,22%	37,82	0,41	1,09%
Inter-laboratoires	21,89	0,07	0,31%	37,24	0,46	1,22%
Inter-lots	21,45	0,41	1,93%	37,00	0,13	0,36%

Variabilité de EIEC/Shigella spp.	Master mix D / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	26,00	0,45	1,73%	37,31	1,23	3,29%
Inter-jours	20,27	0,35	1,74%	36,63	0,74	2,03%
Inter-opérateurs	20,44	0,48	2,37%	36,04	0,68	1,88%
Inter-laboratoires	20,03	0,63	3,16%	36,29	1,62	4,46%
Inter-lots	20,00	0,03	0,16%	36,01	0,30	0,84%

Variabilité de EPEC	Master mix D / HEX					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	26,45	0,07	0,26%	37,88	0,74	1,94%
Inter-jours	20,16	0,35	1,72%	35,45	0,78	2,21%
Inter-opérateurs	19,99	0,29	1,47%	35,11	0,68	1,94%
Inter-laboratoires	20,51	0,22	1,05%	35,89	0,72	2,00%
Inter-lots	20,16	0,27	1,35%	34,94	0,46	1,31%

Variabilité de ETEC	Master mix D / Texas Red					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	27,62	0,18	0,66%	35,86	0,86	2,41%
Inter-jours	19,60	0,42	2,15%	35,53	0,48	1,34%
Inter-opérateurs	19,19	0,09	0,48%	36,12	0,92	2,55%
Inter-laboratoires	19,31	0,16	0,81%	36,25	0,07	0,19%
Inter-lots	18,90	0,30	1,57%	35,48	0,01	0,02%

Variabilité de P. shigelloides	Master mix E / FAM					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	26,55	0,06	0,23%	32,24	0,12	0,38%
Inter-jours	19,33	0,47	2,43%	35,79	0,78	2,17%
Inter-opérateurs	19,53	0,57	2,93%	36,03	0,92	2,54%
Inter-laboratoires	19,05	0,62	3,23%	35,84	0,92	2,57%
Inter-lots	18,79	0,29	1,52%	35,14	0,44	1,26%

Variabilité de EAEC	Master mix E / HEX					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	27,20	0,07	0,27%	35,61	0,52	1,47%
Inter-jours	20,13	0,34	1,67%	35,15	0,79	2,25%
Inter-opérateurs	19,99	0,34	1,68%	35,87	0,08	0,22%
Inter-laboratoires	20,51	0,19	0,95%	35,72	0,09	0,25%
Inter-lots	19,98	0,35	1,77%	34,83	0,41	1,18%

Variabilité de EHEC O157	Master mix E / Texas Red					
	concentration « haute » de l'échantillon			concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	28,05	0,06	0,23%	36,39	0,46	1,27%
Inter-jours	19,35	0,51	2,65%	35,87	0,58	1,61%
Inter-opérateurs	21,20	0,43	2,04%	37,03	0,04	0,11%
Inter-laboratoires	19,98	0,06	0,32%	35,97	0,26	0,73%
Inter-lots	19,60	0,10	0,49%	35,95	0,37	1,03%

Performances cliniques

La performance clinique du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology a été déterminée à l'aide de 401 échantillons de selles comprenant des échantillons positifs et négatifs. L'étude a été menée au Centre National de Référence des Campylobacters (CNR des Campylobacters et Hélicobacters / CHU Bordeaux, France).

Les échantillons utilisés dans cette étude ont été qualifiés à l'aide de trois kits de panel de bactéries entériques de PCR qui sont marqués CE et/ou de cultures bactériennes par le Centre National de Référence des Campylobacters.

Trois kits PCR différents provenant de deux fabricants différents ont été utilisés comme PCR de référence pour couvrir toutes les cibles du panel AMPLIQUICK.

Le tableau de contingence ci-dessous montre la performance de détection du test BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology, en comparaison avec la PCR de référence.

Qualification de l'échantillon		Référence PCR	
		Positif	Négatif
BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology	Positif	344	1 (+1)*
	Négatif	2*	54

*Un échantillon s'est révélé faussement négatif pour EHEC (stx1/stx2) et faussement positif pour *Salmonella spp.*

La sensibilité et la spécificité cliniques ont été calculées par cible bactérienne. La sensibilité clinique de cinq cibles (toxine cholérique, *Vibrio spp.*, souche hypervirulente de *C. difficile*, ETEC et *Plesiomonas shigelloides*) n'a pas été calculée car le nombre d'échantillons testés positifs est très faible. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Master mix	Cible	Vrai positif	Vrai négatif	Faux positif	Faux négatif	Sensibilité (95 % CI)	Spécificité (95 % CI)
A	<i>Campylobacter spp</i>	196	205	0	0	100 % (98,14 à 100 %)	100 % (98,22 à 100 %)
	<i>Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis</i>	22	105	0	0	100 % (84,56 à 100 %)	100 % (96,55 à 100 %)
	<i>Salmonella spp</i>	56	344	1	0	100 % (93,62 à 100 %)	99,71% (98,40-99,99%)
B	Souche hypervirulente de <i>C. difficile</i>	0	102	0	0	-	100 % (96,45 à 100 %)
	<i>C. difficile</i> TcdB/CDT	11	102	0	0	100 % (71,51 à 100 %)	100 % (96,45 à 100 %)
	<i>Aeromonas spp</i>	35	63	0	0	100 % (90,00 à 100 %)	100 % (94,31 à 100 %)
C	Toxines du choléra	0	110	0	0	-	100 % (96,70 à 100 %)
	<i>Vibrio spp</i>	2	110	0	0	-	100 % (96,70 à 100 %)
D	EIEC/ <i>Shigella spp</i>	39	362	0	0	100 % (90,97 à 100 %)	100 % (98,99 à 100 %)
	EPEC	46	37	0	0	100 % (92,29 à 100 %)	100 % (90,51 à 100 %)
	ETEC	8	74	1	0	-	98% (92,79-99,97%)
E	EAEC	36	47	0	0	100 % (90,26 à 100 %)	100 % (92,45 à 100 %)
	EHEC	32	319	0	2	94,12% (80,32-99,28%)	100 % (98,85 à 100 %)
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	64	0	0	-	100 % (94,40 à 100 %)

11. LIMITES

- Le non-respect des instructions de cette notice d'utilisation peut nuire à la performance du test et/ou invalider le résultat du test.
- Ce test ne permet pas de différencier *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* car ces derniers sont détectés dans le même canal fluorescent.
- Ce test ne permet pas de différencier les souches de *C. difficile* portant la séquence codant la toxine B et/ou codant la toxine binaire, car elles sont détectées dans le même canal fluorescent.
- La possibilité d'obtenir des résultats faussement positifs ou faussement négatifs ne peut être exclue (par exemple, en cas de contamination accidentelle, en cas de mauvaise qualité de l'échantillon ou si la procédure de test n'a pas été correctement suivie). Par conséquent, comme pour tous les tests diagnostiques, les résultats doivent être interprétés en fonction des autres informations cliniques dont dispose le médecin.
- Les échantillons de selles liquides peuvent induire des résultats faussement négatifs en raison de la dilution. Dans le cas d'échantillons liquides, nous recommandons d'effectuer l'extraction de l'échantillon de selles directement en ajoutant 200µL d'échantillon.


12. BIBLIOGRAPHIE

1. Graves, N.S. (2013). Acute Gastroenteritis. Primary Care: Clinics in Office Practice 40, 727–741. 10.1016/j.pop.2013.05.006.
2. Bányai, K., Estes, M.K., Martella, V., and Parashar, U.D. (2018). Viral gastroenteritis. The Lancet 392, 175–186. 10.1016/S0140-6736(18)31128-0.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). "Outbreak of Salmonella Infections Linked to Backyard Poultry." 2020.
4. European Food Safety Authority (EFSA). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017." EFSA Journal, 2018; 16(12):5500.
5. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. Salmonella Nomenclature. J Clin Microbiol 38: https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000.

6. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2020. Stockholm: ECDC; 2024.
7. Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y. Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis Detection in Foods. J Pathog. 2011;2011:735308. doi: 10.4061/2011/735308. Epub 2011 Oct 5. PMID: 22567341; PMCID: PMC3335482.
8. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):687-720. doi: 10.1128/CMR.00006-15. PMID: 26062576; PMCID: PMC4462680.
9. World Health Organization (WHO). "Campylobacter." Fact sheet, 2020.
10. Janda JM, Abbott SL. The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan;23(1):35-73. doi: 10.1128/CMR.00039-09. PMID: 20065325; PMCID: PMC2806660.
11. Yuwono C, Wehrhahn MC, Liu F, Zhang L. 2023. Enteric Aeromonas Infection: a Common Enteric Bacterial Infection with a Novel Infection Pattern Detected in an Australian Population with Gastroenteritis. Microbiol Spectr 11:e00286-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00286-23>.
12. Guh AY, Kuty PK. Ann Intern Med. 2018 October 02; 169(7)
13. Spigaglia P *et al*. Clostridium difficile causing pediatric infections: New findings from a hospital-based study in Italy. Anaerobe. 2017 Dec;48:262-268. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.10.008.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.
15. Janda JM, Abbott SL, McIver CJ. Plesiomonas shigelloides Revisited. Clin Microbiol Rev. 2016 Apr;29(2):349-74. doi: 10.1128/CMR.00103-15. PMID: 26960939; PMCID: PMC4786884.
16. World Health Organization (WHO). "Cholera." Fact sheet, 2020.
17. Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. and Martinez-Urtaza, J. (2010), Environmental occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus: a European perspective. Environmental Microbiology Reports, 2: 7-18. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00096.x>
18. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review. Int J Mol Sci. 2021 Sep 14;22(18):9922. doi: 10.3390/ijms22189922. PMID: 34576083; PMCID: PMC8468683.
19. Shigella species and characteristics: "Shigellose : symptômes, traitement, prévention." Institut Pasteur.
20. Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M., and Karch, H. (1999). Escherichia coli O157:H7 and O157:H Σ Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. J. CLIN. MICROBIOL. 37.
21. Stephan, R., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., and Karch, H. (2009). Phenotypic and Genotypic Traits of Shiga Toxin–Negative *E. coli* O157:H7/H Σ - Bovine and Porcine Strains. Foodborne Pathogens and Disease 6, 235–243. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0205>.

13. SYMBOLES INTERNATIONAUX

	Consulter la notice d'utilisation ou la notice d'utilisation électronique		Suffisant pour <n> tests
	Numéro de catalogue		Dispositif médical pour diagnostic <i>in vitro</i>
	Limites de température		Date limite d'utilisation
	Fabricant		Numéro de lot
	Mandataire en Suisse		Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé et consulter la notice d'utilisation
	Identifiant unique du dispositif		Contrôle positif
	Contrôle négatif		Contrôle procédural
	Master mix contrôle		À conserver à l'abri de la lumière
	Master mix		Sachet de barrettes de bouchons optiques
	Microplaques préremplies		Détection qualitative par PCR
	Ne pas réutiliser		Format de tubes bulk

	Importateur		
---	-------------	--	--

14. INFORMATIONS FABRICANT



BIOSYNEX S.A.
 22 boulevard Sébastien Brant
 67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France

Standard :
 Tel. : +33 3 88 78 78 87

www.biosynex.com

Contacts France :
 Tel. : +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com

Contacts autres pays :
 Tel. : +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com

SAV :
 Tel. : +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com

CH REP

BIOSYNEX SWISS S.A.
 Route de Rossemaison 100
 2800 DELEMONT - Suisse

15. HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

Version du document	Paragraphe modifié	Détail des changements
V1	Tous	Nouveau produit, création de la notice d'utilisation

ANNEXE 1

Souches bactériennes	Master mix A			Master mix B			Master mix C			Master mix D			Master mix E		
	<i>Campylobacter spp</i>	<i>Yersinia spp</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>C.difficile Hypervirulent</i>	<i>C.difficile TcdB/CDT</i>	<i>Aeromonas spp</i>	Toxines du choléra	<i>Vibrio spp</i>	<i>E.coli O157</i>	<i>E.coli EIEC/Shigella spp</i>	<i>E.coli EPEC</i>	<i>E.coli ETEC</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>E.coli EAEC</i>	<i>E.coli EHEC</i>
	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)
<i>Escherichia coli</i> (EAEC) MBC121 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-
<i>Escherichia coli</i> (EIEC) MBC122 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (EPEC) MBC123 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ETEC) MBC124 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (VTEC) MBC022 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	Déecté
<i>Escherichia coli</i> O111/NM (Zeptomatrix)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> DSMZ 5570	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i> DSMZ 7532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> DSMZ 4782	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> DSMZ 103303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> MBC089 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i> RM 3195 (ATCC)	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i> RM 2228 (ATCC)	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> NCTC 10842 (ATCC)	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> MBC088 (VIRCELL)	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i> MBC043 (VIRCELL)	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 001	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 014	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 020	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 027	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 033	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 078	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> hypervirulent Souche 4118 (ATCC)	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas caviae</i> DSMZ 7323	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas dhakensis</i> DSMZ 18362	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas veronii</i> DSMZ 7386	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> DSMZ 30187	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> NCTC 2476 (ATCC)	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> MBC027 (VIRCELL)	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Souches bactériennes	Master mix A			Master mix B			Master mix C			Master mix D			Master mix E		
	<i>Campylobacter spp</i>	<i>Yersinia spp</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>C.difficile Hypervirulent</i>	<i>C.difficile TcdB/CDT</i>	<i>Aeromonas spp</i>	Toxines du choléra	<i>Vibrio spp</i>	<i>E.coli O157</i>	<i>E.coli EIEC/Shigella spp</i>	<i>E.coli EPEC</i>	<i>E.coli ETEC</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>E.coli EAEC</i>	<i>E.coli EHEC</i>
	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)
<i>Salmonella enteritidis</i> MBC003 (VIRCELL)	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> MBC044 (VIRCELL)	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GNI14 (ATCC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> EB101 (ATCC)	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> DSMZ 10143	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> MBC118 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 EL Tor ctxB1 (tcpA El Tor)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctxB3 (tcpA El Tor)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctxB7 (tcpA El Tor)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 classique (ctxB1, tcp1 classique)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O139	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O37 (tcpA classique)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O141 (ctxB, tcpA classique)	-	-	-	-	-	-	Déecté	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139 (ctxB & tcpA neg)	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139 (ctxB & tcpA neg)	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> Souche 1	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> Souche 2	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Souche 1	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Souche 2	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	Déecté	-	-	-	-	-	-	-

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology

PCR FOR THE QUALITATIVE DETECTION OF GASTROINTESTINAL BACTERIA IN STOOL SAMPLES.

In vitro diagnostic medical device for professional use.

REF 3150046_SEC01 / 3150046_SEC02 / 3150046_BLK96

1. INTENDED PURPOSE

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology is a molecular *in vitro* diagnostic test for the qualitative detection of 15 pathogenous agents commonly associated with gastroenteritis : *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella spp.*, *Clostridioides difficile*, *Clostridioides difficile* hypervirulent strains, *Aeromonas spp.*, Cholera toxin, *Vibrio spp.*, *Escherichia coli* O157 strain, Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)/*Shigella spp.*, Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and *Plesiomonas shigelloides*.

The test is an aid in the diagnosis of bacterial gastroenteritis performed using a purified DNA extract obtained from stool samples collected with BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment or with FecalSwab™ (Copan). For a syndromic diagnosis, the PCR can be performed simultaneously with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology test (ref. 3150047 and related references) using the same samples and the same amplification program. This non-automated test is intended for *in vitro* diagnostic use in laboratory by professionals only.

2. CLINICAL SUMMARY

Gastroenteritis is the inflammation of the gastrointestinal tract that causes diarrhea, abdominal pain, nausea, fever and sometimes vomiting. This inflammation affects nearly 1.7 billion children every year and is a leading cause of death in children under five years old mainly due to severe dehydration (World Health Organization). It can be provoked by many different infectious agents such as parasites (10-15%), bacteria (15-20%) and viruses (50-70%) that are spread by the fecal-oral route through the contamination of food and water.¹

The disease symptoms usually occur 6 hours to 5 days after the infection and can last from 2-7 days. Diarrhea is the most common clinical symptom of gastrointestinal infections. Other symptoms may appear along with diarrhea such as abdominal pain, nausea, vomiting, hemorrhagic diarrhea (in the case of EHEC infection for instance) and fever. These symptoms can be severe, and in the lack of accurate and prompt diagnosis, it can lead to serious consequences, including death. The diagnosis of such disease should be carried out on patients suffering from acute diarrhea and/or any of the symptoms listed above, to allow the administration of specific treatment in patients with severe gastroenteritis especially for those with bloody stool, prolonged illness or with chronic conditions.²

The most common pathogenic bacteria that trigger gastrointestinal infections include *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Campylobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Clostridioides difficile*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio spp.*, *Escherichia coli*, and *Shigella spp.*

- *Salmonella* remains a major cause of acute gastroenteritis, with notable outbreaks in Europe (2017) and the US (2020).^{3,4} The *Salmonella* genus, part of the Enterobacteriaceae family, comprises two species: *Salmonella bongori* and *Salmonella enterica*, both of which are Gram-negative rods. *Salmonella enterica* is the most common species and is divided into six subspecies, comprising more than 2,500 different serotypes, the best known of which are *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis*.⁵ *Salmonella bongori* is a distinct species of *Salmonella*, less common than *Salmonella enterica*. Unlike *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* lacks certain islands of pathogenicity (SPI2), which makes it less common than *Salmonella enterica*. *Salmonella* is mainly transmitted through the consumption of contaminated

food, such as meat, eggs, raw milk and certain dairy products. Direct contact with infected animals, particularly reptiles, can also be a source of contamination.

- The *Yersinia* genus, also within the Enterobacteriaceae family, comprises 11 Gram-negative bacillus species including three human pathogens *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* are associated with gastrointestinal infections, particularly in winter. *Yersinia* is a leading cause of gastroenteritis, with the European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) reporting 7,048 cases of yersiniosis in 2019.⁶ *Y. enterocolitica* is more common in cooler climates and can grow at refrigeration temperatures, making it a concern for food safety.⁷ *Y. pseudotuberculosis* causes a disease like tuberculosis in animals, hence its name; *Y. pseudotuberculosis* infections are less common than those caused by *Y. enterocolitica*. Both species share several virulence factors, such as the ability to invade intestinal cells and evade the host immune response. They are both zoonotic pathogens, meaning they can be transmitted from animals to humans.
- *Campylobacter* infections are among the most widespread infectious diseases, increasing in both developed and developing countries over the past decade.⁸ According to the WHO, *Campylobacter* is a global cause of diarrheal diseases.⁹ The genus includes several Gram-negative species that are spiral, curved, or rod-shaped. *C. jejuni* and *C. coli* are major causes of human gastroenteritis, while species like *C. upsaliensis* and *C. fetus* are emerging pathogens. The main reservoirs are animals, particularly birds, pigs, and domestic pets.
- *Aeromonas* species are emerging pathogens causing various human diseases, including septicemia, wound infections, and gastroenteritis.^{10,11} They are commonly found in aquatic environments. The incidence of *Aeromonas* in gastroenteritis ranges from 2% to 10%, depending on the country. The genus includes 14 Gram-negative rod-shaped species, with *A. caviae*, *A. veronii*, *A. dhakensis*, and *A. hydrophila* being most associated with human infections. *A. caviae* is known for its ability to form biofilms, which can enhance its survival in various environments and contribute to its pathogenicity. *A. veronii* produces various virulence factors and it is a significant cause of gastroenteritis, especially in children. *A. dhakensis* can cause severe infections in humans and it is considered more virulent than *A. hydrophila*, with which it is often confused. Molecular tools are essential for accurate detection.¹¹ *A. hydrophila* is widely distributed in freshwater environments and is known for its ability to survive in various conditions, including low temperatures; moreover, it resists to chlorination and can persist in contaminated water.
- *Clostridioides difficile* is a Gram-positive, spore-forming bacterium that can cause severe gastrointestinal infections, particularly after antibiotic use.¹² Its virulence is primarily mediated by two enterotoxins, TcdA and TcdB, which destroy the actin cytoskeleton of intestinal cells. TcdB is considered more potent and widespread than TcdA, and it is primarily responsible for the cytotoxic effect seen in *C. difficile* infections. Moreover, it is possible to distinguish a hypervirulent strain which secretes more TcdA and TcdB thanks to a deletion in the regulatory sequence of the operon. In addition of those two toxins, some strains produce a third toxin, the binary toxin *C. difficile* transferase (CDT), which can also contribute to the pathogen virulence and disease. Interestingly, some *C. difficile* strains, such as RT033 and RT442, do not possess the classical TcdA/TcdB toxins, produce the binary toxin, provoke gastroenteritis and are mostly missed during diagnosis.¹³ *C. difficile* caused over 453,000 gastroenteritis cases in the US in 2011 and is listed in the highest priority category of antimicrobial resistance threats by the ECDC.¹⁴ The infections are challenging to treat for several reasons: highly resistant and long-lived spores; resistance to antibiotics; proliferation after disruption of the normal gut microbiota; biofilm formation and recurrent infections. When antibiotic treatment fails, Fecal Microbiota Transplantation is an alternative approach to get rid of recurrent infections. Probiotics and immunotherapy are also being explored as adjunct therapies to enhance treatment efficacy and prevent recurrence.
- *Plesiomonas shigelloides* is a Gram-negative, rod-shaped bacterium that belongs to the Enterobacteriaceae family. It is globally distributed but predominantly found in tropical areas, where it primarily inhabits freshwater, especially during warmer months.¹⁵ It is often associated

with aquatic animals like fish, shellfish and amphibians but also some terrestrial animals. *P. shigelloides* can cause gastroenteritis, often leading to diarrhea, especially after consuming contaminated water or seafood.¹⁵

- The *Vibrio* genus includes Gram-negative, rod-shaped bacteria that naturally inhabit freshwater and marine environments. The most common pathogenic species are *V. cholerae*, *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus*. *V. cholerae* causes severe diarrheal illness, with an estimated 3-5 million infections worldwide annually. The species has over 200 serogroups, with O1 being the most predominant.¹⁶ *V. parahaemolyticus* is ubiquitous in temperate and tropical coastal areas, causing around 30,000 infections annually. *V. vulnificus* is an opportunistic pathogen affecting patients with chronic diseases.¹⁷
- *Escherichia coli* is a Gram-negative, rod-shaped bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family. From the first hours after birth, it colonizes the gastrointestinal tract of infants, becoming part of a normal and healthy microbiota through a commensal relationship. However, *E. coli* can cause disease under certain conditions, such as in immunocompromised hosts or when the gastrointestinal barrier is breached. Pathogenic *E. coli* is responsible for approximately 2 million deaths annually, particularly in children under five years old. Each *E. coli* pathotype has its characteristic pathogenic mechanism and a specific profile of virulence factors.¹⁸ We can distinguish four main virulence classes: colonization, fitness, toxins and effectors, each of which consists of specific virulence factor with a defined function and activity. Seven pathotypes of *E. coli* have been identified, including the five most associated with gastroenteritis: enteroaggregative (EAEC), enteroinvasive (EIEC), shiga-toxin secreting *E. coli* (STEC, including enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), with the O157 serotype being the most common in recent European outbreaks, enteropathogenic (EPEC) and enterotoxigenic (ETEC). These pathotypes can differ in colonization and/or cellular invasion strategies; moreover, they are distinguished by the presence or absence of various virulence genes, such as the stx1/stx2 toxins in EHEC.¹⁸ These virulence genes can be encoded by plasmids or in chromosomal regions. It is crucial to distinguish the pathotype of *E. coli* in the context of gastroenteritis, as different pathotypes can cause a variety of symptoms and require specific therapeutic approaches. Some pathotypes of *E. coli*, such as enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) or enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), can cause symptoms ranging from watery diarrhea to bloody diarrhea and severe abdominal cramps. For example, EHEC can lead to hemorrhagic colitis and serious extraintestinal complications such as hemolytic uremic syndrome. In addition, knowing the pathotype helps to identify potential sources of contamination and to implement appropriate preventive measures. For example, EHEC is often associated with the consumption of undercooked meat and unpasteurized dairy products. Treatments may vary as well depending on the pathotype: for example, the use of antibiotics may be contraindicated for certain pathotypes such as EHEC, as this can worsen symptoms. Finally, it is also of epidemiological interest, as the surveillance and the control of epidemics require precise identification of the pathotype to understand modes of transmission and implement effective public health interventions.
- *Shigella* is a leading cause of mortality due to diarrheal diseases, accounting for 212,000 deaths in 2016. The *Shigella* genus includes Gram-negative, rod-shaped bacteria that are genetically closely related to *E. coli*. There are four *Shigella* species: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, and *S. sonnei*.¹⁹ *Shigella* invades the epithelial cells of the intestinal mucosa, leading to severe inflammation and tissue destruction. It also produces several toxins contributing to its pathogenicity. *Shigella* and EIEC are so closely related genetically that they are often considered to be part of the same pathovar within the genus *Escherichia*; they also share the same virulence plasmid. *Shigella*, particularly *S. flexneri*, tends to cause more severe disease with a pronounced inflammatory response compared to EIEC. In France and industrialized countries, the most common serogroup is *S. sonnei*, but it is also emerging worldwide, including in developing countries. In the past, *Shigella dysenteriae* serotype 1 (or *Shiga bacillus*) caused deadly epidemics. Since 2011, no more strains of this serotype have been reported.

3. TEST PRINCIPLE

The assay consists of a multiplex PCR allowing the specific amplification and the simultaneous detection of bacterial genes and/or toxins specific to *Campylobacter*, *Salmonella*, *Vibrio* and *Aeromonas* species, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, cholera toxin genes, *Plesiomonas shigelloides*, 5 different pathotypes of *E. coli* EPEC, EAEC, ETEC, EHEC, EIEC and *Shigella spp.*, as well as an indication of the presence of the *E. coli* O157 strain.

The assay is composed of 5 different master mixes. The targets and the detection channels for each master mix are detailed in the table below.

Master Mixes	Channel	Bacterial pathogens	Target genes/sequences
A	FAM	<i>Campylobacter spp.</i>	16S (<i>C. jejuni/C. coli</i>) lpxA (<i>C. upsaliensis</i>) gyrB (<i>C. fetus</i>)
	HEX	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	YST ail
	TxRed	<i>Salmonella spp.</i>	invA
	Cy5	Internal amplification control	CIEZ
B	FAM	<i>Clostridioides difficile</i> Hypervirulent	tcdC ^{A117}
	HEX	<i>Clostridioides difficile</i> ToxB/Binary toxin	tcdB, CDT
	TxRed	<i>Aeromonas spp.</i> (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. dhakensis</i> and <i>A. caviae</i>)	gyrB
	Cy5	Internal amplification control	CIEZ sequence
C	FAM	Cholera toxins	ctxAB, tcpA
	HEX	<i>Vibrio spp.</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. Parahaemolyticus</i> , <i>V. alginolyticus</i> and <i>V. fluvialis</i>)	ATPsynthase
	TxRed	<i>E. coli</i> O157 strain	z3276
	Cy5	Internal amplification control	CIEZ sequence
D	FAM	<i>Shigella spp./E. coli</i> EIEC	ipaH
	HEX	<i>E. coli</i> EPEC	eaeA, bfp
	TxRed	<i>E. coli</i> ETEC	lt1/sta
	Cy5	Internal amplification control	CIEZ sequence
E	FAM	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	HugA
	HEX	<i>E. coli</i> EAEC	aggR, aap
	TxRed	<i>E. coli</i> EHEC	stx1, stx2
	Cy5	Control in process	Rp49

An exogenous internal control CIEZ, as well as an exogenous control in process Rp49 are included: The Internal Control CIEZ is detected in the Cy5 channel of Mix A, B, C and D while the exogenous Control in Process Rp49 is detected in the Cy5 channel of Mix E.

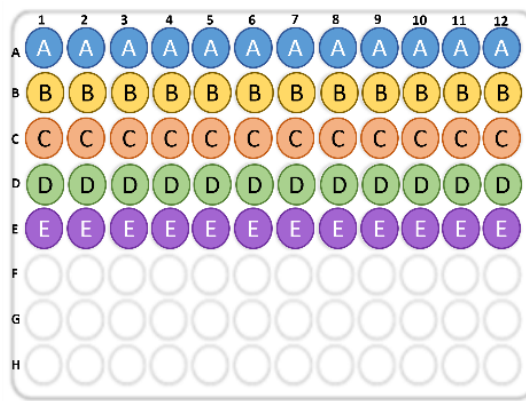
The test is based on real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology by fluorescent probe hydrolysis. This method uses probes labeled with FAM, HEX, Texas Red and Cy5 for the amplification of bacterial targets and Cy5-labeled probes for the detection of the sequences used as controls the CIEZ and the Rp49. It should be noted that the detection of the CIEZ internal control validates the PCR amplification step and rules out a possible false negative result due to PCR inhibition. Rp49 is a known DNA sequence from *Drosophila* that is absent in the human and bacterial genomes and is therefore added to stool samples as an extraction control, also known as a control in process. The

supplementation of the Rp49 exogenous sequence in the fecal samples and its detection allow to control the quality of the biological sample and to validate the genomic material purification step.

The increase in the fluorescence signal is only detected if the target sequence is complementary to the amplified probe present in the sample. The fluorescent signal is therefore directly proportional to the amplification of the target during the amplification phase. The Cq value (quantification cycle) corresponds to the number of cycles during which the fluorescence increases exponentially above the background noise.

BIO SYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology is available in two formats :

- In bulk tubes (ref. 3150046_BLK96): each master mix is provided in a microtube for the user to dispense in PCR plates.
- In prefilled microplates (ref. 3150046_SEC01 and 3150046_SEC02): each master mix is distributed in one well of each strip according to order shown below.



Regardless the packaging, the Master mixes are ready-to-use and contains dNTPs, MgCl₂, primers and fluorescent probes, Taq polymerase enzyme, and reaction buffer.

BIO SYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology must be used with stool sample collected and treated with BIO SYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) or collected with FecalSwab™ (Copan). Regardless the collection system used, the nucleic acids must be extracted and purified before performing the amplification step.

4. REQUIRED MATERIAL

3150046_SEC01 or 3150046_SEC02	3150046_BLK96
Kit composition	
<ul style="list-style-type: none"> - 5 dividable 96-wells microplates prefilled with the five master mixes (Mmix) - 1 tube of positive control (CONTROL +, red cap) - 1 tube of negative control (CONTROL -, green cap) - 1 tube of control in process (CONTROL IP, yellow cap) - 1 tube of master mix control (CONTROL Mmix, blue cap) - 5 bags of optical cap strips 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 tube of Master Mix A (Mmix A, white cap marked B1) - 1 tube of Master Mix B (Mmix B, white cap marked B2) - 1 tube of Master Mix C (Mmix C, white cap marked B3) - 1 tube of Master Mix D (Mmix D, white cap marked B4) - 1 tube of Master Mix E (Mmix E, white cap marked B5) - 1 tube of positive control (CONTROL +, red cap) - 1 tube of negative control (CONTROL -, green cap) - 2 tubes of control in process (CONTROL IP, yellow cap)

	- 1 tube of master mix control (CONTROL Mmix, blue cap)
Material required but not provided	
- BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) or FecalSwab™ transport medium (Copan, ref. 470CE) - DNA extraction kit - Powder-free disposable gloves - Pipettes and filtered tips - PCR microplate or microtubes centrifuge - qPCR Thermal Cycler	- BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) or FecalSwab™ transport medium (Copan, ref. 470CE) - DNA extraction kit - Powder-free disposable gloves - Pipettes and filtered tips - PCR microplate or microtubes with optical caps - PCR microplate or microtubes centrifuge - qPCR Thermal Cycler

The PCR thermal cycler used for the test must have the following main characteristics:

- Open system
- Real-time quantitative PCR assays
- Programmable Thermal Cycler block

Reference	Thermal cycling block
3150046_SEC01	0.1mL low profile
3150046_SEC02	0.2mL high profile

- Excitation source: Leds, lamp or laser
- Filter sets (excitation/emission wavelengths) suitable for the detection of "reporter" fluorophores of the FAM, HEX, TxRed and Cy5 probes.
- Connection with a computer using specific analysis software that allow the recovery of fluorescence data, absolute quantification assays, and the interpretation of results.

The kit has been developed and validated with the following real-time PCR thermal cycler:

- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad)
- CFX96 OPUS™ Real-Time PCR Detection System (BioRad)
- QuantGene 9600 (Bioer)
- QuantStudio™ 5 System (Applied Biosystems™)

If another thermal cycler is used, please perform your own validation of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit before using the test. We recommend using qualified samples and the negative and positive controls provided in the kit.

5. PRECAUTIONS

- Carefully follow these instructions for use. Failure to follow any instruction of this IFU may adversely affect the test performance and have harmful consequences.
- Follow Good Laboratory Practice and wear powder-free laboratory disposable gloves throughout the test procedure.
- The daily management of many samples and the high sensitivity of the PCR technique can, in the absence of precaution, generate false positive results by contamination. Pre-handling PCR, post-PCR and DNA extraction should therefore be performed in separate rooms. Wear disposable gloves in each room and change them before moving between different rooms.
- The provided strips of caps are for single use only. Do not reuse them. Do not open the PCR tubes or microplates at the end of the test.
- For the prefilled kit formats (ref. 3150046_SEC01 and 3150046_SEC02): Do not use the test if aluminum foil is opened or damaged. Once the aluminum foil is removed, use the test immediately.
- Do not use the kit if it is received defrosted.

- Do not use the kit in case of breakage or leakage. In the event of damage to the packaging only (no breakage or leakage), the kit remains usable.
- Protect the kit from light.
- Centrifuge each tube before opening and open them one after the other, closing them tightly between each one to avoid contamination.
- The positive control (CONTROL +) contains significant amounts of DNA sequences. It can therefore potentially contaminate the other components of the kit if good molecular biology practices are not followed. To limit this risk of contamination, it is recommended to store the positive control separately from the other components of the kit, preferably outside the kit on the first opening.
- The negative and positive controls included in the kit mimic results obtained with negative or positive samples respectively. They must be used with each run.
- To ensure that there is no contamination during handling, it is left to the user to include as part of their internal quality approach, at the frequency chosen, an additional negative control well in which 5µL of molecular biology grade water are added to the Master mix.
- When using negative and positive controls with a series of patients, it is recommended to first deposit the negative control, then deposit the patient samples, and to finish with the deposition of the positive control.
- Dispose of soiled parts or empty kit components in a trash bin suitable for biological waste.
- The device contains material of bacterial or animal origin and should be handled with caution.
- If, in relation to the use of BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology, a death or a serious deterioration of health has occurred, this should be reported to the manufacturer and the competent authority of your country. If in doubt, report it.
- Safety data sheet available on request. Summary of safety and performance will be available online on Eudamed.

6. KIT STORAGE

The kit is shipped frozen. Kit components must arrive frozen. Store the kit at a temperature below or equal to -20°C. Under these conditions, the reagents are stable until the expiry date indicated on the kit label. Do not use the kit and any of its components after the expiry date. Protect the kit and the reagents from direct light.

The master mixes in bulk format (3150046_BLK96) and the Control Master mix in the kit can undergo 16 freeze/thaw cycles without the shelf-life and qualities of the product being altered. The controls (including the Control In Process) of the kit can undergo 30 freeze/thaw cycles without the shelf-life and qualities of the product being altered.

NB: Only thaw the number of well strips or plates needed for the prefilled kit format. As the plates and strips are ready to use, there is no need for repeated thaw/freeze cycles.

7. SPECIMENS/CONTROLS COLLECTION AND STORAGE

The stool sample should be collected with BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) or with FecalSwab™ (Copan) from feces collected in a preservative-free container.

For sample collection and storage, please refer to the instructions for use of BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment or FecalSwab™ (Copan).

Repeated freeze/thaw cycles of samples should be avoided.

The transport of clinical samples must comply with local regulations for the transport of infectious agents.

8. TEST PROCEDURE

1. Sample preparation:

Add 5µL of the control in process (CONTROL IP, yellow cap) in the sample preparation (i.e. FecalSwab™ or BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment tube with the stool sample).

2. Extraction of nucleic acids:

The nucleic acids extraction must be performed before the amplification protocol using a suitable extraction system for bacterial DNA. Please follow the manufacturer's instructions for use.

The positive and negative controls provided in the kit should not undergo extraction and should be used as provided.

The BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit has been validated with the following extraction kits:

- Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen (ref. 744215.4) with the MagnetaPure 32 Automated System (Dutscher)
- QIAGEN QIAampFAST DNA Stool Mini Kit (ref. 51604).

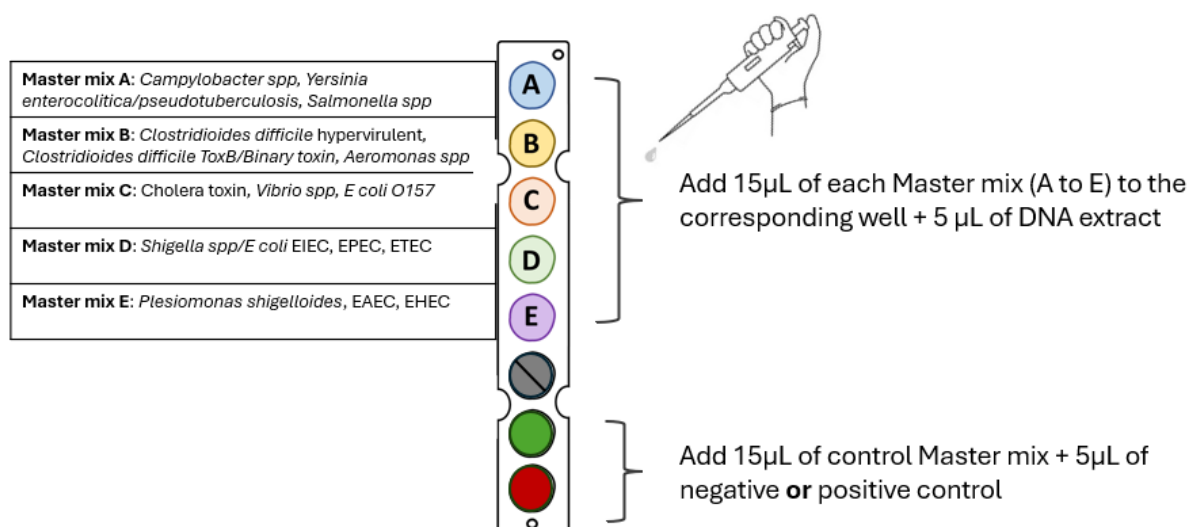
If another DNA extraction method or kit is used, please perform your own validation method of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit using positive and negative qualified samples supplemented with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology control in process.

3. Amplification protocol:

It is recommended that the Master mixes be placed on a refrigerated rack or on ice while samples are being added.

For microplates prefilled with ready-to-use master mixes (REF 3150046_SEC01 & 3150046_SEC02):

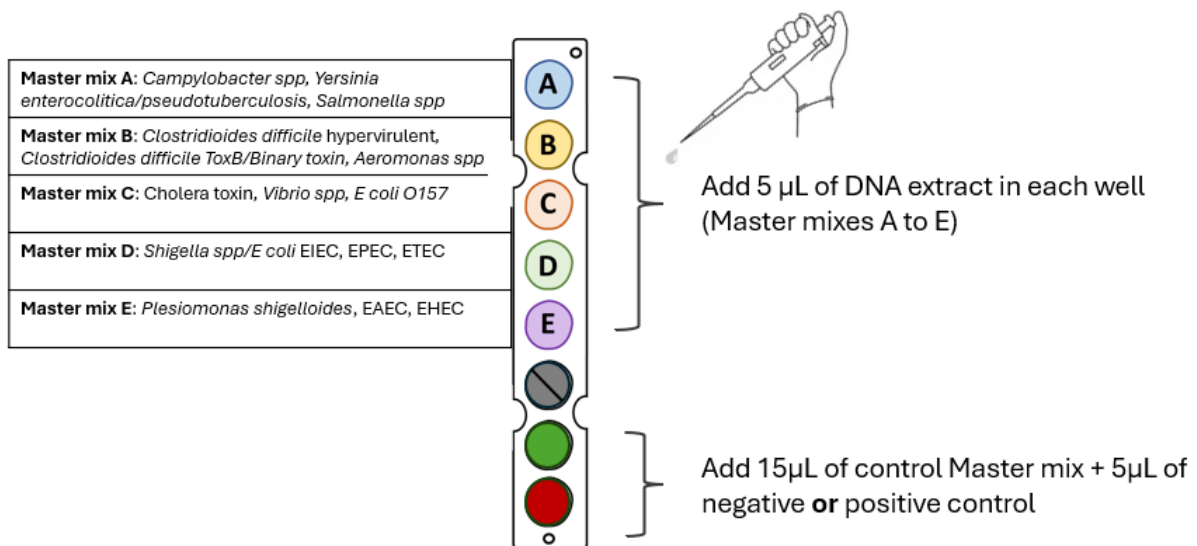
1. Take from the freezer the number of strips or plates needed.
2. Centrifuge for 10 seconds to remove any droplets from the walls of the wells or the aluminum sealing foil.
3. Add 15µL of Control master mix to wells G and H of a single strip. If you are using multiple strips at the same time, it is not necessary to deposit control master mix into each strip.
4. Add 5 µL of negative control to well G containing the control mix added in the previous step.
5. Add 5µL of extraction eluate from the same sample into the wells containing the master mixes (wells from line A to line E as shown on the picture below).
6. Finally, add 5µL of positive control in well H containing the Master mix control added in step 4
7. Close the plate or strips using the provided caps and centrifuge once more for 10 seconds to eliminate potential bubbles at the surface.



With tubes of bulk ready-to-use master mixes (REF 3150046_BLK96):

1. Remove the Master mixes tubes from the freezer and allow them to thaw on ice or refrigerated rack.
2. Centrifuge the tubes for 10 seconds to remove any droplets from the sides or caps.
3. Dispense 15 μ L of each Master mix into PCR tubes or plate. Each Master Mix must be deposited in a separate well. So, for each patient, 5 wells enable a diagnosis over the entire panel.
4. Dispense 15 μ L of control master mix in two empty wells for the controls.
5. Add 5 μ L of negative control to one of the tube/well containing the control Master mix added in the previous step.
6. Add 5 μ L of extraction eluate from the same sample to the various dedicated reaction wells (Master mixes A to E).
7. Finally, add 5 μ L of positive control in the last tube/well containing the Master mix control added in step 4.
8. Close the wells with optical caps or film.
9. Centrifuge for 10 seconds.
10. Return the master mixes tubes to the freezer.

N.B. To limit the loss of reagent, it is important to pipette the Master Mix without plunging the tip completely into the volume of Master Mix. Alternatively, you could use the “low-binding” or “low retention” tips to limit reagent loss.



Place the plate, strips or tubes in the thermal cycler and run the following amplification program:

Step	Repetitions	Temperature	Duration	Acquisition
Reverse transcription	1x	45°C	15 min	-
Taq Activation	1x	95°C	2 min	-
Denaturation	50x	95°C	5 sec	-
Hybridation / Elongation		60°C	20 sec	yes

If you use :

- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BioRad)
- CFX96 OPUS™ Real-Time PCR Detection System (BioRad)

To analyze the amplification data, please select **Apply fluorescent drift correction**.

Enter 20 μ L as the reaction volume into the Thermal Cycler program.

Please refer to the operating instructions of the Thermal Cycler used for programming information.

If a syndromic diagnosis is performed using the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology kit in simultaneously, for the detailed BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology kit test procedure, please refer to the kit instructions for use.

Detection channels settings :

Master mixes	Channel	Bacterial target/genes
A	FAM	<i>Campylobacter spp.</i>
	HEX	<i>Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis</i>
	TxRed	<i>Salmonella spp.</i>
	Cy5	Internal amplification control
B	FAM	<i>Clostridioides difficile</i> Hypervirulent
	HEX	<i>Clostridioides difficile</i> ToxB/Binary toxin
	TxRed	<i>Aeromonas spp.</i> (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. dhakensis</i> and <i>A. caviae</i>)
	Cy5	Internal amplification control
C	FAM	Cholera toxins
	HEX	<i>Vibrio spp.</i> (<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>)
	TxRed	<i>E. coli</i> O157 strain
	Cy5	Internal amplification control
D	FAM	<i>Shigella spp./</i> EIEC
	HEX	EPEC
	TxRed	EPEC
	Cy5	Internal amplification control
E	FAM	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
	HEX	EAEC
	TxRed	EHEC
	Cy5	Control in process

9. INTERPRETATION OF RESULTS

The threshold of the real-time PCR reaction corresponds to the level of signal that reflects a statistically significant increase in fluorescence emission compared to the baseline signal calculated; the value is set to distinguish a significant amplification signal from background noise. We recommend automatic setting of the threshold by the real-time PCR instrument software, rather than manual setting. If further settings should be done for the test, please contact the thermal cycler manufacturer's technical support team.

Samples:

Signals above the threshold, **and visually consistent with a classical PCR amplification curve**, are considered positive results. Please take into consideration the amplification curves of the positive control from the kit as reference.

Some samples may show atypical curves that are not characteristic of amplification curves. In this case, the result should not be considered as interpretable, and the analysis of the sample should be repeated in a new PCR run that includes positive and negative controls. Cq cut-off values should also be considered when interpreting the results.

Result interpretations and Cq cut-off values are given per target/channel in the table below.

Samples can be positive for one or more pathogens detected in the same well or in different wells.

Quality control:

Internal control

The internal control CIEZ ensures that the enzymes in the Master mix are functional. Indeed, an amplification curve needs to be observed in Cy5 channel of Master mixes A, B, C and D. The internal control value must preferentially be detected before 35 cycles ($Cq \leq 35$). Nevertheless, 2 two situations of lack of amplification of the internal control can be observed:

- If the target genes are initially present in the sample with a high number of copies, the internal control may not be amplified. This result is consistent and does not invalidate the test. It should be interpreted as a positive result despite the lack of signal from the internal control. This phenomenon is the result of amplification competition between the Internal Control and targets that are present at high copy numbers.
- If the target genes in the FAM, HEX and Texas Red channels are not amplified, as well as the internal control in the Cy5 channel, then no result can be rendered. This situation highlights the presence of PCR inhibitors or a technical problem occurring during test realization. The PCR should be repeated:
 - after diluting the obtained DNA extract at 1/10
 - or after realizing a new extraction / purification of the nucleic acids.

Control in process (CONTROL IP, yellow cap)

The exogenous Control in Process Rp49 should be detected in the Cy5 channel of Mix E. This procedural control validates the quality of the biological sample collection and validates the DNA extraction and purification steps.

In the absence of an amplification signal for the procedural control, the test is considered invalid when no target has been detected. In this case, the nucleic acids extraction or the sample treatment must be repeated.

Negative control (CONTROL -, green cap)

The fluorescence emitted must be below the threshold except for the Cy5 channel. This is an indicator of non-specific amplification. If the fluorescence is above the threshold, check for an atypical curve. In the case of an amplification curve, a contamination or a distribution error in the microtubes should be considered.

Positive control (CONTROL +, red cap)

The value of the positive control should preferably be detected before 30 cycles ($Cq \leq 30$) in the four channels (FAM, HEX, TxRed and Cy5). In the absence of amplification of the positive control, the existence of an amplification problem can be suggested. Some samples show atypical curves that are not characteristic of sigmoid amplification curves. In this case, the result should not be considered interpretable, and the sample should be analyzed again.

Master mix A				Sample interpretation
<i>Campylobacter</i> spp (16S/pxA/gyrB)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (yst) / <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (ail)	<i>Salmonella</i> spp (invA)	Internal control (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	-	-	+/- $Cq \leq 35$	Positive for <i>Campylobacter</i> species (<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. upsaliensis</i> , <i>C. fetus</i>)
-	+	-	+/- $Cq \leq 35$	Positive for <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>pseudotuberculosis</i>
-	-	+	+/- $Cq \leq 35$	Positive for <i>Salmonella</i> species
-	-	-	+ $Cq \leq 35$	Negative for the tested pathogens

Master mix B				Sample interpretation
<i>C. difficile</i> Hypervirulent (<i>TcdC^{Δ117}</i>)	<i>C. difficile</i> (<i>TcdB/CDT</i>)	<i>Aeromonas spp</i> (<i>gyrB</i>)	Internal control (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>Clostridioides difficile</i> Hypervirulent strain
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>Clostridioides difficile</i> Toxin B or Binary Toxin
-	-	+ Cq<41	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>Aeromonas</i> species (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. dhakensis</i>)
+/-	-	-	+ Cq ≤ 35	Negative for the tested pathogens

Master mix C				Sample Interpretation
Cholera toxins (<i>ctxAB/TcpA</i>)	<i>Vibrio spp</i> (<i>ATPsynthase</i>)	<i>E. coli</i> O157 strain (<i>z3276</i>)	Internal Control (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>Vibrio cholerae</i> with cholera toxin genes
-	+ Cq<40	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>Vibrio</i> species (<i>V. cholerae</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. alginolyticus</i>)
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>E. coli</i> O157 strain
+/-	-	-	+ Cq ≤ 35	Negative for the tested pathogens

Master mix D				Sample Interpretation
<i>E. coli</i> EIEC/ <i>Shigella spp</i> (<i>ipaH</i>)	<i>E. coli</i> EPEC (<i>bfp/eaеA</i>)	<i>E. coli</i> ETEC (<i>It1/sta</i>)	Internal Control (CIEZ)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+ Cq<40	-	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>E. coli</i> EIEC or <i>Shigella</i> species (<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i>)
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>E. coli</i> EPEC
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>E. coli</i> ETEC
-	-	-	+ Cq ≤ 35	Negative for the tested pathogens

Master mix E				Sample interpretation
<i>Plesiomonas shigelloides</i> (<i>HugA</i>)	<i>E. coli</i> EAEC (<i>aggR/aap</i>)	<i>E. coli</i> EHEC (<i>stx1/stx2</i>)	Control in process (Rp49)	
FAM	HEX	TxRed	Cy5	
+	-	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>Plesiomonas shigelloides</i>
-	+	-	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>E. coli</i> EAEC
-	-	+	+/- Cq ≤ 35	Positive for <i>E. coli</i> EHEC
-	-	-	+ Cq ≤ 35	Negative for the tested pathogens

As the E coli pathotypes are detected in different wells, result interpretation in wells C, D and E is required. The table below is an aid for a prompt interpretation.

Master mix C			Master mix D			Master mix E			Sample interpretation
Cholera toxins (ctxAB/TcpA)	<i>Vibrio spp</i> (ATPsynthase)	<i>E. coli</i> O157 strain (z3276)	<i>E. coli</i> EIEC / <i>Shigella spp</i> (ipaH)	<i>E. coli</i> EPEC (bfp/eaecA)	<i>E. coli</i> ETEC (lt1/sta)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (HugA)	<i>E. coli</i> EAEC (aggR/aap)	<i>E. coli</i> EHEC (stx1/stx2)	
FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	
-	-	-	+	-	-	-	-	-	EIEC and/or <i>Shigella spp</i> (<i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i>)
-	-	-	+	-	-	-	-	+	<i>Shigella dysenteriae</i> / <i>Shigella flexneri</i> or co-infection EIEC and EHEC or <i>Shigella spp</i> and EHEC
-	-	-	-	-	-	-	+	-	Typical or atypical EAEC
-	-	-	-	-	+	-	-	-	ETEC
-	-	-	-	+	-	-	-	-	EPEC
-	-	-	-	-	-	-	-	+	EHEC
-	-	+	-	-	-	-	-	+	EHEC O157 strain
-	-	-	-	+	-	-	-	+	STEC (EHEC) or co-infection EPEC and EHEC
-	-	+	-	+	-	-	-	+	STEC (EHEC O157) or co-infection EPEC and EHEC O157 strain
-	-	+	-	-	-	-	-	-	Negative*

*The BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit can detect the O157 serotype of *E. coli* EHEC that is responsible of major outbreaks. The virulence of the EHEC pathotype is mediated by the secretion of shigatoxins (stx1/stx2). Several findings have documented the presence of non-pathogenic *E. coli* O157 strains in feces. These non-pathogenic O157 strains do not carry stx1/stx2 genes and are not associated with gastroenteritis.^{20,21} Therefore, a positive detection of *E. coli* O157 should be interpreted as negative results in the case of negative detection of EHEC (stx1/stx2). The detection results of O157 characterization should be interpreted when only the EHEC is found positive.

10. PERFORMANCES

Analytical sensitivity

Target sequence detection limits:

The detection limit of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit is defined as the concentration, in number of copies/μL, that can be detected at 95% in a DNA sample specific to each target. It has been determined by performing serial dilution of reference samples with a known number of copies.

The LoD₉₅ of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology on DNA samples was statistically determined for each pathogen and targeted gene. Results are given in the following table:

Target	Tested strains	LoD ₉₅ (DNA copy/μL CFU/μL)	LoD ₉₅ (DNA copy/rxn CFU/rxn)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Vircell MBC088-R	0.579	2.895
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC RM 2228	0.245	1.225
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC RM 3195	1.264	6.32
<i>Campylobacter fetus</i>	ATCC NCTC 10842	1.978	9.89
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vircell MBC027	2.221	11.105
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC NCTC 2476	1.167	5.835
<i>Salmonella typhimurium</i>	Vircell MBC044	3.894	19.47
<i>Salmonella enteritidis</i>	Vircell MBC003	3.076	15.38
<i>Clostridium difficile</i> Strain 4118 (Hypervirulent detection)	ATCC 4118	1.092	5.46
<i>Clostridium difficile</i> Strain 4118 (Toxin detection)	ATCC 4118	0.432	2.16
<i>Clostridium difficile</i>	Vircell MBC043	3.607	18.035
<i>Aeromonas veronii</i>	DSMZ 7386	2.562	12.81
<i>Aeromonas dhakensis</i>	DSMZ 18362	4.372	21.86

<i>Aeromonas hydrophilia</i>	DSMZ 30187	2.523	12.615
<i>Aeromonas caviae</i>	DSMZ 7323	1.122	5.61
<i>Vibrio cholerae</i> (Cholera toxin detection)	Vircell MBC118	3.416	17.08
<i>Vibrio cholerae</i> (<i>Vibrio spp</i> detection)	Vircell MBC118	4.345	21.725
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC EB101	2.981	14.905
<i>Vibrio vulnificus</i>	DSMZ 10143	3.328	16.64
<i>E. coli</i> VTEC (O157 serotype detection)	Vircell MBC022	3.570	17.85
<i>E. coli</i> EIEC	Vircell MBC122	2.461	12.305
<i>Shigella flexneri</i>	DSMZ 4782	0.811	4.055
<i>E. coli</i> EPEC	Vircell MBC123	0.722	3.61
<i>E. coli</i> ETEC	Vircell MBC124	5.428	27.14
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC GNI14	9.221	46.105
<i>E. coli</i> EAEC	Vircell MBC121	2.225	11.125
<i>E. coli</i> VTEC (EHEC <i>stx1/stx2</i> detection Mix E/TxRed)	Vircell MBC022	1.820	9.10

Analytical specificity

The design of oligonucleotides was validated *in silico* by BLAST alignment. The comparison of the primer and probe sequences shows that the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit is specific to the detection of the specified targets.

Cross reactivity

A panel of 42 RNA and 72 DNA samples from a biobank, listed in the following tables, were tested using the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit. For all these samples, no amplification of targets in the various master mixes was observed.

RNA		
Astrovirus	Human Parainfluenza 1	Parainfluenza 3
Chikungunya virus	Influenza A H1	Parainfluenza 4 A
Coronavirus	Influenza A H3	Respiratory syncytial virus (subtype A)
Coronavirus Oc43	Influenza A H5	Respiratory syncytial virus (subtype B)
Coronavirus SARS	Influenza B	Rhinovirus
Coxsackie A6	Measles	Rotavirus
Coxsackie B1	MERS Coronavirus	Rubella
Coxsackie B5	Mumps	Sapovirus
Dengue 1	Norovirus	SARS-CoV-2
Dengue 2	Norovirus G1	Tick-Borne Encephalitis virus
Dengue 3	Norovirus G2	West Nile virus
Dengue 4	Novel Influenza A H1N1	Yellow Fever virus
Echovirus 5	Parainfluenza 1	Zika virus
Enterovirus 68	Parainfluenza 2	Zika virus (asian lineage)

DNA		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
Adenovirus	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Adenovirus type 02	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
Adenovirus type 04	Cytomegalovirus	<i>Mycoplasma genitalium</i>
Adenovirus type 11	<i>Enterococcus faecalis</i> (vanB)	<i>Mycoplasma hominis</i>
Adenovirus type 20	<i>Enterococcus faecium</i> (vanA)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Adenovirus type 31	Epstein-Barr virus	<i>Neisseria meningitidis</i> sg A
Adenovirus type 40	<i>Francisella tularensis</i>	Papillomavirus type 16
Adenovirus 41	<i>Gardnerella vaginalis</i>	Papillomavirus type 18
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	Parvovirus b19 (plasmid)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (mecA-)
Bk virus	Herpes simplex 1	<i>Staphylococcus aureus</i> (mecA+)
<i>Bordetella holmesii</i>	Herpes simplex 2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	HHV-6	<i>Toxoplasma gondii</i>

<i>Borrelia burgdorferi</i>	HHV-8	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (NDM-1)	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Varicella-zoster virus
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	-
<i>Clostridioides difficile</i> ribotype 010	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	-

Analytical reactivity

The analytical reactivity of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit was confirmed by testing a panel of 51 DNA of different bacterial strains targeted by this kit. The results are given in Annex 1.

Chemical interference

Various substances that may be present in patients' stool samples may cause positive or negative interference on PCR results. Interference tests on the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit were performed by adding the potential interferent to fecal swab positive samples and tested on the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology:

Tested substances	Tested concentration	Interference observed
Betamethasone	2.5% v/v	None
Hemorrhoid cream (Titanoréine crème)	0.25% v/v	
Mucin	0.8% w/v	
Imodium (Lopéramide-Lyoc)	5% w/v	
Ampicillin sodium salt	152 µmol/L	
Fatty acid supplement	4.8%	
Pepto-Bismol	5%	
Starch	1.5% w/v	
Cellulose	4% w/v	
Pectin	0.01% w/v	
Lubricant	5% v/v	
Ethanol	0.2% v/v	
Urine	20% v/v	
Blood	40% v/v	

Precision data

The precision data for the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit were determined based on 5 conditions:

- Intra-assay variation (within one test run)
- Inter-day variation (between different test runs)
- Inter-operator variation (between different operators)
- Inter-laboratory variation (between different locations)
- Inter-batch variation (between different batches)

The precision data are expressed in terms of mean Cq value, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV), based on the threshold quantification cycle (Cq) values for the DNA of the various targets. Intra-assay variability data for the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit was determined on 30 replicate tests using negative and positive bacterial samples for each bacterial target. The SD and CV determinations showed that the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit is repeatable with CV<5%. Inter-days, inter-operators, inter-laboratories and inter-batches variabilities were determined on duplicate tests from extracted bacterial DNA. The BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology results are reproducible with CV<5%.

The variability per target is given in the tables below:

<i>C. jejuni</i> variability	Master mix A / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	24.71	0.09	0.37%	36.47	0.98	2.70%
Inter-days	19.77	0.50	2.51%	36.10	0.85	2.35
Inter-operators	19.43	0.57	2.93%	35.53	0.55	1.54
Inter-laboratories	19.85	0.77	3.87%	36.13	1.43	3.95%
Inter-batches	19.93	0.06	0.3%	35.31	0.18	0.5%

<i>C. fetus</i> variability	Master mix A / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	24.31	0.08	0.33%	33.85	0.22	0.64%
Inter-days	20.28	0.35	1.72%	36.53	0.84	2.30%
Inter-operators	20.42	0.34	1.64%	36.98	0.17	0.45%
Inter-laboratories	20.46	0.31	1.54%	35.46	0.20	0.57%
Inter-batches	20.34	0.35	1.72%	36.03	0.63	1.76%

<i>C. upsaliensis</i> variability	Master mix A / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	24.17	0.11	0.46%	34.55	0.31	0.89%
Inter-days	19.75	0.28	1.41%	35.73	0.52	1.44%
Inter-operators	19.75	0.18	0.91%	36.34	0.35	0.95%
Inter-laboratories	19.33	0.12	0.60%	35.20	1.32	3.75%
Inter-batches	20.59	0.80	3.88%	35.70	0.35	0.98%

<i>Y. enterocolitica</i> variability	Master mix A / HEX					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	26.38	0.06	0.21%	35.78	0.64	1.79%
Inter-days	20.43	0.41	2.03%	35.58	0.33	0.94%
Inter-operators	20.28	0.25	1.22%	35.75	0.31	0.86%
Inter-laboratories	20.85	0.33	1.59%	35.58	0.28	0.79%
Inter-batches	20.24	0.52	2.59%	35.03	0.26	0.75%

<i>Y. pseudotuberculosis</i> variability	Master mix A / HEX					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	23.57	0.06	0.26%	34.51	0.90	2.61%
Inter-days	18.82	0.41	2.19%	35.21	0.20	0.56%
Inter-operators	18.82	0.11	0.60%	35.09	0.10	0.27%
Inter-laboratories	19.17	0.51	2.64%	35.54	0.01	0.02%
Inter-batches	18.45	0.23	1.23%	35.13	0.00	0.01%

<i>S. enteritidis</i> variability	Master mix A / Texas Red					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	27.31	0.08	0.30%	35.98	0.47	1.31%
Inter-days	19.91	0.72	3.60%	35.94	0.89	2.47%
Inter-operators	19.54	0.59	3.02%	36.55	0.28	0.77%
Inter-laboratories	20.30	0.16	0.78%	36.14	0.11	0.31%
Inter-batches	19.95	0.6	3.03%	35.28	0.65	1.85%

<i>C. difficile</i> hypervirulent variability	Master mix B / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	25.24	0.06	0.22%	34.17	0.59	1.74%
Inter-days	19.43	0.54	2.76%	35.37	0.28	0.79%
Inter-operators	19.10	0.56	2.93%	35.47	0.20	0.56%
Inter-laboratories	19.62	0.82	4.16%	34.77	1.24	3.56%
Inter-batches	19.57	0.12	0.60%	35.01	0.14	0.39%

<i>C. difficile</i> toxins variability	Master mix B / HEX					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	25.47	0.07	0.29%	34.89	0.50	1.44%
Inter-days	19.79	0.40	2.04%	35.51	0.45	1.28%
Inter-operators	19.64	0.29	1.46%	35.28	0.25	0.71%
Inter-laboratories	20.22	0.23	1.14%	36.55	0.74	2.02%
Inter-batches	19.84	0.24	1.23%	34.84	0.35	0.99%

<i>A. veronii</i> variability	Master mix B / Texas Red					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	25.78	0.06	0.22%	34.86	0.37	1.07%
Inter-days	20.29	0.57	2.81%	36.72	0.97	2.63%
Inter-operators	19.96	0.55	2.76%	36.81	1.40	3.79%
Inter-laboratories	20.81	0.05	0.25%	36.79	0.27	0.74%
Inter-batches	20.44	0.64	3.11%	35.79	0.20	0.55%

Cholera toxin variability	Master mix C / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	27.24	0.09	0.34%	36.34	0.88	2.41%
Inter-days	20.15	0.54	2.70%	36.54	0.74	2.03%
Inter-operators	19.78	0.65	3.27%	36.20	0.71	1.96%
Inter-laboratories	20.29	0.77	3.78%	36.10	0.72	2.01%
Inter-batches	20.18	0.05	0.25%	36.20	0.41	1.14%

<i>Vibrio spp</i> variability	Master mix C / HEX					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	27.21	0.08	0.30%	35.58	0.85	2.38%
Inter-days	20.36	0.38	1.84%	35.62	0.64	1.80%
Inter-operators	20.22	0.25	1.24%	36.39	1.01	2.77%
Inter-laboratories	20.76	0.25	1.21%	36.25	1.52	4.20%
Inter-batches	20.34	0.28	1.39%	35.36	0.42	1.19%

EHEC O157 variability	Master mix C / Texas Red					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	28.00	0.07	0.23%	35.23	0.42	1.19%
Inter-days	21.40	0.63	2.94%	37.62	0.47	1.26%
Inter-operators	21.10	0.68	3.22%	37.82	0.41	1.09%
Inter-laboratories	21.89	0.07	0.31%	37.24	0.46	1.22%
Inter-batches	21.45	0.41	1.93%	37.00	0.13	0.36%

EIEC/ <i>Shigella spp</i> variability	Master mix D / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	26.00	0.45	1.73%	37.31	1.23	3.29%
Inter-days	20.27	0.35	1.74%	36.63	0.74	2.03%
Inter-operators	20.44	0.48	2.37%	36.04	0.68	1.88%
Inter-laboratories	20.03	0.63	3.16%	36.29	1.62	4.46%
Inter-batches	20.00	0.03	0.16%	36.01	0.30	0.84%

EPEC variability	Master mix D / HEX					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	26.45	0.07	0.26%	37.88	0.74	1.94%
Inter-days	20.16	0.35	1.72%	35.45	0.78	2.21%
Inter-operators	19.99	0.29	1.47%	35.11	0.68	1.94%
Inter-laboratories	20.51	0.22	1.05%	35.89	0.72	2.00%
Inter-batches	20.16	0.27	1.35%	34.94	0.46	1.31%

ETEC variability	Master mix D / Texas Red					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	27.62	0.18	0.66%	35.86	0.86	2.41%
Inter-days	19.60	0.42	2.15%	35.53	0.48	1.34%
Inter-operators	19.19	0.09	0.48%	36.12	0.92	2.55%
Inter-laboratories	19.31	0.16	0.81%	36.25	0.07	0.19%
Inter-batches	18.90	0.30	1.57%	35.48	0.01	0.02%

<i>P. shigelloides</i> variability	Master mix E / FAM					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	26.55	0.06	0.23%	32.24	0.12	0.38%
Inter-days	19.33	0.47	2.43%	35.79	0.78	2.17%
Inter-operators	19.53	0.57	2.93%	36.03	0.92	2.54%
Inter-laboratories	19.05	0.62	3.23%	35.84	0.92	2.57%
Inter-batches	18.79	0.29	1.52%	35.14	0.44	1.26%

EAEC variability	Master mix E / HEX					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	27.20	0.07	0.27%	35.61	0.52	1.47%
Inter-days	20.13	0.34	1.67%	35.15	0.79	2.25%
Inter-operators	19.99	0.34	1.68%	35.87	0.08	0.22%
Inter-laboratories	20.51	0.19	0.95%	35.72	0.09	0.25%
Inter-batches	19.98	0.35	1.77%	34.83	0.41	1.18%

EHEC O157 variability	Master mix E / Texas Red					
	"High" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	28.05	0.06	0.23%	36.39	0.46	1.27%
Inter-days	19.35	0.51	2.65%	35.87	0.58	1.61%
Inter-operators	21.20	0.43	2.04%	37.03	0.04	0.11%
Inter-laboratories	19.98	0.06	0.32%	35.97	0.26	0.73%
Inter-batches	19.60	0.10	0.49%	35.95	0.37	1.03%

Clinical performance

The clinical performance of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology kit was determined using 401 stool samples including positive and negative samples. The study was conducted at the French National Reference Center of Campylobacter (CNR des Campylobacters et Hélicobacters / CHU Bordeaux, France).

Samples used in this study were qualified using three PCR enteric bacterial panel kits that are CE-marked and/or bacterial cultures by the National Reference Center of Campylobacters.

Three different PCR kits from two different manufacturers were used as reference PCRs to cover all targets in the AMPLIQUICK panel.

The contingency table below shows the detection performance of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology test, in comparison with the reference PCR.

Sample qualification		Reference PCR	
		Positives	Negatives
BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Bacteriology	Positives	344	1 (+1)*
	Negatives	2*	54

*One sample was found falsely negative for EHEC (stx1/stx2) and falsely positive for *Salmonella spp.*

The clinical sensitivity and specificity were calculated per bacterial target. The clinical sensitivity of five targets (Cholera toxin, *Vibrio spp.*, *C. difficile* hypervirulent strain, ETEC and *Plesiomonas shigelloides*) were not calculated as the number of positive tested samples is very low. Results are given in the table below.

Master Mix	Target	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
A	<i>Campylobacter spp</i>	196	205	0	0	100% (98.14-100%)	100% (98.22-100%)
	<i>Yersinia enterocolitica/Yersinia pseudotuberculosis</i>	22	105	0	0	100% (84.56-100%)	100% (96.55-100%)
	<i>Salmonella spp</i>	56	344	1	0	100% (93.62-100%)	99.71% (98.40-99.99%)
B	<i>C. difficile</i> Hypervirulent strain	0	102	0	0	-	100% (96.45-100%)
	<i>C. difficile</i> TcdB/CDT	11	102	0	0	100% (71.51-100%)	100% (96.45-100%)
	<i>Aeromonas spp</i>	35	63	0	0	100% (90.00-100%)	100% (94.31-100%)
C	Cholera toxins	0	110	0	0	-	100% (96.70-100%)
	<i>Vibrio spp</i>	2	110	0	0	-	100% (96.70-100%)
D	EIEC/ <i>Shigella spp</i>	39	362	0	0	100% (90.97-100%)	100% (98.99-100%)
	EPEC	46	37	0	0	100% (92.29-100%)	100% (90.51-100%)
	ETEC	8	74	1	0	-	98% (92.79-99.97%)
E	EAEC	36	47	0	0	100% (90.26-100%)	100% (92.45-100%)
	EHEC	32	319	0	2	94.12% (80.32-99.28%)	100% (98.85-100%)
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2	64	0	0	-	100% (94.40-100%)




















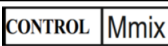



11. LIMITATIONS

- Failure to follow any instructions of the IFU may adversely affect the test performance and/or invalidate the test result.
- This test cannot differentiate between *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* as they are detected in the same fluorescent channel.
- This test cannot differentiate between *C. difficile* strains carrying the sequence coding the Toxin B and/or coding the Binary toxin as they are detected in the same fluorescent channel.
- The possibility to obtain false positive or false negative results cannot be ruled out (e.g. in case of accidental contamination, in case of poor quality of the sample or in case the test procedure is not correctly followed). Hence, as with all diagnostic tests, results must be considered with other clinical information available to the physician.
- Liquid stool samples may induce false-negative results due to dilution. In case of liquid samples, we recommend performing the extraction of stool sample directly by adding 200µL of sample.

12. LITERATURE

1. Graves, N.S. (2013). Acute Gastroenteritis. Primary Care: Clinics in Office Practice 40, 727–741. 10.1016/j.pop.2013.05.006.
2. Bányai, K., Estes, M.K., Martella, V., and Parashar, U.D. (2018). Viral gastroenteritis. The Lancet 392, 175–186. 10.1016/S0140-6736(18)31128-0.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “Outbreak of Salmonella Infections Linked to Backyard Poultry.” 2020.
4. European Food Safety Authority (EFSA). “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017.” EFSA Journal, 2018; 16(12):5500.
5. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. Salmonella Nomenclature. J Clin Microbiol 38: 2011;2011:735308. doi: 10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000.
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual Epidemiological Report for 2020. Stockholm: ECDC; 2024.
7. Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y. Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis Detection in Foods. J Pathog. 2011;2011:735308. doi: 10.4061/2011/735308. Epub 2011 Oct 5. PMID: 22567341; PMCID: PMC3335482.
8. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):687-720. doi: 10.1128/CMR.00006-15. PMID: 26062576; PMCID: PMC4462680.
9. World Health Organization (WHO). “Campylobacter.” Fact sheet, 2020.
10. Janda JM, Abbott SL. The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan;23(1):35-73. doi: 10.1128/CMR.00039-09. PMID: 20065325; PMCID: PMC2806660.
11. Yuwono C, Wehrhahn MC, Liu F, Zhang L. 2023. Enteric Aeromonas Infection: a Common Enteric Bacterial Infection with a Novel Infection Pattern Detected in an Australian Population with Gastroenteritis. Microbiol Spectr 11:e00286-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.00286-23.
12. Guh AY, Kuty PK. Ann Intern Med. 2018 October 02; 169(7)
13. Spigaglia P et al. Clostridium difficile causing pediatric infections: New findings from a hospital-based study in Italy. Anaerobe. 2017 Dec;48:262-268. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.10.008.
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.
15. Janda JM, Abbott SL, McIver CJ. Plesiomonas shigelloides Revisited. Clin Microbiol Rev. 2016 Apr;29(2):349-74. doi: 10.1128/CMR.00103-15. PMID: 26960939; PMCID: PMC4786884.
16. World Health Organization (WHO). “Cholera.” Fact sheet, 2020.
17. Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. and Martinez-Urtaza, J. (2010), Environmental occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus: a European perspective. Environmental Microbiology Reports, 2: 7-18. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00096.x
18. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic Escherichia coli: A Review. Int J Mol Sci. 2021 Sep 14;22(18):9922. doi: 10.3390/ijms22189922. PMID: 34576083; PMCID: PMC8468683.
19. Shigella species and characteristics: “Shigellose : symptômes, traitement, prévention.” Institut Pasteur.
20. Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M., and Karch, H. (1999). Escherichia coli O157:H7 and O157:Hx Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. J. CLIN. MICROBIOL. 37.
21. Stephan, R., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., and Karch, H. (2009). Phenotypic and Genotypic Traits of Shiga Toxin–Negative E. coli O157:H7/Hx Bovine and Porcine Strains. Foodborne Pathogens and Disease 6, 235–243. https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0205.

13. INTERNATIONAL SYMBOLS

	Consult instructions for use or electronic instructions for use		Contains sufficient for <n> tests
	Catalogue number		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Do not reuse		Bag of optical cap strips
	Temperature limits		Use-by-date
	Manufacturer		Batch code
	Keep away from sunlight		Importer
	Authorized representative in Switzerland		Do not use if package is damaged and consult the instructions for use
	Unique device identifier		Master Mix
	Positive control		Negative control
	Control in process		Master mix control
	Prefilled microplates format		Bulk tubes format
	Qualitative detection by PCR		

14. MANUFACTURER INFORMATION



BIOSYNEX S.A.

22 boulevard Sébastien Brant
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France
Tel : +33 3 88 78 78 87
www.biosynex.com

Contact France:

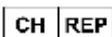
Tel.: +33 3 88 77 57 00
service.clients@biosynex.com

Contact other countries :

Tel.: +33 3 88 77 57 52
sales@biosynex.com

After-sales service:

Tel: +33 3 88 77 57 25
Tech.support@biosynex.com



BIOSYNEX SWISS S.A.

Route de Rossemaison 100
2800 DELEMONT - Switzerland

15. HISTORIC MODIFICATION

Record version	Amended paragraph	Change details
V1	All	Creation of the IFU

ANNEXE 1

Bacterial strains	Master mix A			Master mix B			Master mix C			Master mix D			Master mix E		
	<i>Campylobacter spp</i>	<i>Yersinia spp</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>C.difficile Hypervirulent</i>	<i>C.difficile TcdB/CDT</i>	<i>Aeromonas spp</i>	Cholera toxins	<i>Vibrio spp</i>	<i>E.coli O157</i>	<i>E.coli EIEC/Shigella spp</i>	<i>E.coli EPEC</i>	<i>E.coli ETEC</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>E.coli EAEC</i>	<i>E.coli EHEC</i>
	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)
<i>Escherichia coli</i> (EAEC) MBC121 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-
<i>Escherichia coli</i> (EIEC) MBC122 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (EPEC) MBC123 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ETEC) MBC124 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (VTEC) MBC022 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	Detected
<i>Escherichia coli</i> O111/NM (Zeptomatrix)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> DSMZ 5570	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i> DSMZ 7532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> DSMZ 4782	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> DSMZ 103303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> MBC089 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i> RM 3195 (ATCC)	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i> RM 2228 (ATCC)	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter fetus</i> NCTC 10842 (ATCC)	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> MBC088 (VIRCELL)	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i> MBC043 (VIRCELL)	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 001	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 014	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 020	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 027	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 033	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> Ribotype 078	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridioides difficile</i> hypervirulent Strain 4118 (ATCC)	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas caviae</i> DSMZ 7323	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas dhakensis</i> DSMZ 18362	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas veronii</i> DSMZ 7386	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> DSMZ 30187	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> NCTC 2476 (ATCC)	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> MBC027 (VIRCELL)	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bacterial strains	Master mix A			Master mix B			Master mix C			Master mix D			Master mix E		
	<i>Campylobacter spp</i>	<i>Yersinia spp</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>C.difficile Hypervirulent</i>	<i>C.difficile TcdB/CDT</i>	<i>Aeromonas spp</i>	Cholera toxins	<i>Vibrio spp</i>	<i>E.coli O157</i>	<i>E.coli EIEC/Shigella spp</i>	<i>E.coli EPEC</i>	<i>E.coli ETEC</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>E.coli EAEC</i>	<i>E.coli EHEC</i>
	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)	(FAM)	(HEX)	(TxRed)
<i>Salmonella enteritidis</i> MBC003 (VIRCELL)	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> MBC044 (VIRCELL)	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i> GNI14 (ATCC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> EB101 (ATCC)	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> DSMZ 10143	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> MBC118 (VIRCELL)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 EL Tor ctxB1 (tcpA El Tor)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctxB3 (tcpA El Tor)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor ctxB7 (tcpA El Tor)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 classical (ctxB1, tcp1 classical)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O139	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O37 (tcpA classical)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O141 (ctxB, tcpA classical)	-	-	-	-	-	-	Detected	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139 (ctxB & tcpA neg)	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139 (ctxB & tcpA neg)	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> Strain 1	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i> Strain 2	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Strain 1	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Strain 2	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	Detected	-	-	-	-	-	-	-

