

# BIO SYNEX

## Ampliquick Fecal Virology

**REF** 3150047\_SEC01 / 3150047\_SEC02 / 3150047\_BLK96

FR (FRANÇAIS / FRENCH) .....	2
EN (ENGLISH) .....	16

### CONTENTS

## BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology

DÉTECTION QUALITATIVE DES VIRUS GASTRO-INTESTINAUX À PARTIR D'ÉCHANTILLONS DE SELLES.

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

**REF** 3150047\_SEC01 / 3150047\_SEC02 / 3150047\_BLK96

### 1. DESTINATION

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology est un test de diagnostic moléculaire *in vitro* pour la détection qualitative par RT-qPCR de la présence de virus gastro-intestinaux : rotavirus, sapovirus, astrovirus, norovirus GI/GII et adénovirus F40/41 dans des échantillons de selles humaines. Le test est une aide au diagnostic de la gastro-entérite virale réalisée à l'aide d'un extrait d'ADN/ARN 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 Bacteriology (réf. 3150046 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. 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<sup>1</sup>.

Les virus communément associés à la gastro-entérite sont le rotavirus, le sapovirus, l'astrovirus, le norovirus et l'adénovirus.

Les rotavirus sont la cause la plus fréquente de diarrhée chez les enfants dans le monde<sup>2</sup>. Ces virus non enveloppés sont constitués de trois capsides concentriques qui englobent un génome d'ARN double brin. Il existe 10 espèces différentes de rotavirus (espèces A-J), l'espèce A étant la plus répandue dans les infections gastro-intestinales.

Les sapovirus sont associés à moins de 5 % des cas de gastro-entérite dans le monde. Ce sont des virus à ARN monocaténaire, non enveloppés, de petite taille (30 à 38 nm), classés en cinq génogroupes différents (GI-GV).

Les astrovirus sont de petits virus à ARN monocaténaire non enveloppés, classés en huit génotypes différents. L'infection par les astrovirus est très courante car une proportion importante de la population est porteuse d'anticorps contre l'astrovirus de type 1.

Les norovirus sont des virus à ARN monocaténaire dont le génome est relativement petit. Ces virus sont divisés en cinq génogroupes différents (GI-GV) : les GI, GII et GIV sont connus pour infecter les humains. Les génogroupes GI et GII sont les plus couramment associés à la gastro-entérite. Environ 685 millions de cas de norovirus sont détectés chaque année.

Les adénovirus sont la troisième cause la plus fréquente d'infections gastro-intestinales chez les enfants (9 % des enfants atteints de gastro-entérite). Il s'agit de virus non enveloppés de taille moyenne, de 70 à 90 nm, constitués d'une nucléocapside icosaédrique contenant un génome d'ADN double brin (26 à 45 Kbp). Il existe 88 types d'adénovirus humains différents, regroupés en sept espèces (A à G). Les sérotypes F40 et F41 sont les sérotypes d'adénovirus les plus fréquemment retrouvés dans les selles des patients<sup>3,4</sup>.

### 3. PRINCIPE DU TEST

Le test AMPLIQUICK Fecal Virology utilise une seule étape de PCR (Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne par polymérase) pour amplifier et détecter simultanément une région spécifique du génome viral de rotavirus, sapovirus, astrovirus, norovirus, adénovirus, un contrôle interne exogène CIEZ et un contrôle exogène procédural Rp49. Le test est composé de deux master mix différents : le master mix A, qui permet la détection des

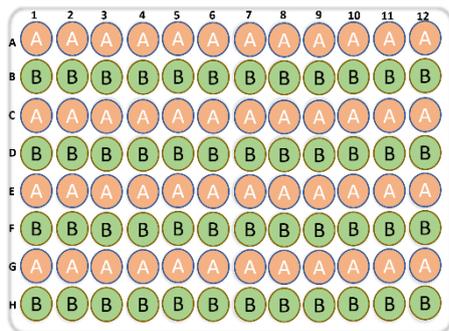
rotavirus, sapovirus et astrovirus, et le master mix B, qui cible la détection des norovirus GI/GII et des adénovirus F40/41.

Le test est basé sur la technologie de transcription inverse en temps réel et de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) par hydrolyse d'une sonde fluorescente. Cette méthode utilise des sondes marquées avec les fluorophores FAM, HEX et Texas Red pour l'amplification des séquences virales et des sondes marquées avec le fluorophore 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 viraux. Elle est donc ajoutée aux échantillons de selles en tant que contrôle d'extraction, également connu sous le nom de contrôle procédural (Control in process). 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 matériel génomique.

L'augmentation du signal fluorescent n'est détectée que si la séquence cible complémentaire de la sonde amplifiée est présente dans l'échantillon. Le signal fluorescent est donc directement proportionnel à l'amplification de la cible pendant la phase d'amplification. La valeur Cq (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 Virology est disponible en deux formats :

- Au format Bulk (réf. 3150047\_BLK96) : chaque master mix est fourni dans un microtube pour que l'utilisateur puisse le distribuer dans des plaques PCR.
- Au format microplaques pré-remplies (réf. 3150047\_SEC01 et 3150047\_SEC02) : les master mix sont distribués dans les puits d'une plaque PCR selon l'ordre indiqué ci-dessous.



Quel que soit leur conditionnement, les master mix sont prêts à l'emploi et contiennent des dNTP, du MgCl<sub>2</sub>, des amorces et des sondes fluorescentes, de l'enzyme Taq polymérase, de la transcriptase inverse et du tampon de réaction.

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology doit être utilisé avec un échantillon de selles collecté avec FecalSwab™ (Copan) ou collecté et traité avec BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (réf. 3150065). Quel que soit le système de collecte utilisé, les acides nucléiques doivent être extraits et purifiés avant l'étape d'amplification.

#### 4. MATERIEL REQUIS

3150047_SEC01	3150047_SEC02	3150047_BLK96
<b>Composition du kit</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 microplaques sécables au format 96 puits pour une utilisation avec un thermocycleur 0,1 ml low-profile (SEC01)/0,2 ml high-profile (SEC02)</li> <li>- 1 tube de contrôle positif (CONTROL+, bouchon rouge)</li> <li>- 1 tube de contrôle négatif (CONTROL-, bouchon vert)</li> <li>- 2 tubes de contrôle procédural (CONTROL IP, bouchon jaune)</li> <li>- 1 tube de master mix contrôle (CONTROL Mmix, bouchon bleu)</li> <li>- 2 sachets contenant des barrettes de bouchons de 12x8 puits</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 tubes de master mix A (Mmix A, bouchon blanc marqué V1)</li> <li>- 4 tubes de master mix B (Mmix B, bouchon blanc marqué V2)</li> <li>- 1 tube de contrôle positif (CONTROL+, bouchon rouge)</li> <li>- 1 tube de contrôle négatif (CONTROL-, bouchon vert)</li> <li>- 2 tubes de contrôle in process (CONTROL IP, bouchon jaune)</li> <li>- 1 tube de master mix contrôle (CONTROL Mmix, bouchon bleu)</li> </ul>

Matériel nécessaire mais non fourni :	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (réf. 3150065) ou milieu de transport FecalSwab® (Copan) (réf. 470CE)</li> <li>- Kit d'extraction d'ADN/ARN</li> <li>- Gants jetables non poudrés</li> <li>- Pipettes et cônes à filtre</li> <li>- Thermocycleur qPCR</li> <li>- Centrifugeuse pour microplaque PCR ou microtubes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (réf. 3150065) ou milieu de transport FecalSwab® (Copan) (réf. 470CE)</li> <li>- Kit d'extraction d'ADN/ARN</li> <li>- Gants jetables non poudrés</li> <li>- Pipettes et cônes à filtre</li> <li>- Thermocycleur qPCR</li> <li>- Plaques PCR ou barrettes de tubes + films ou bouchons de scellage optique</li> <li>- Centrifugeuse pour microplaque PCR ou microtubes</li> </ul>

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
3150047_SEC01	0,1 ml low-profile
3150047_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 Virology 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 entraîner 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/ARN 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 formats de kits pré-remplis \_SEC01 et \_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 barrettes PCR avant de les ouvrir ; ouvrir chaque barrette PCR individuellement et la refermer rapidement après utilisation. Ne pas ouvrir plusieurs barrette PCR simultanément afin d'éviter toute contamination croisée.

- 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 expérimental (blanc) dans lequel 5 µl d'eau de qualité biologie moléculaire sont ajoutés aux master mixes.
- 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 souillés 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 Virology, 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 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 de péremption 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.

Le master mix contrôle peut subir 16 cycles de congélation-décongélation et tubes de master mix au format bulk (\_BLK96) peuvent subir 10 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) 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).

## 8. PROCEDURE DE TEST

Pour les échantillons dans FecalSwab™ : le contrôle procédural (control in process) peut être ajouté à l'avance. Les échantillons d'écouvillons fécaux déchargés dans le milieu de transport et additionnés du contrôle procédural AMPLIQUICK Fecal Virology peuvent être conservés jusqu'à 72 heures à température ambiante ou à 4 °C et jusqu'à une semaine entre -20 °C et -80 °C avant de procéder à l'extraction de l'acide nucléique et au test avec le kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology.

### 1. Préparation de l'échantillon :

Ajouter 5 µL du contrôle procédural (CONTROL IP, bouchon jaune) dans la préparation de l'échantillon (c'est-à-dire le tube de Fecal Pretreatment ou FecalSwab™ 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/ARN viral. 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 Virology a été validé avec les kits d'extraction suivants :

- Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen réf. 744215 utilisant le système d'automatisation Magnetapure fourni par Dutscher
- QIAGEN QIAampFAST DNA Stool Mini Kit (réf. 51604)
- Réactifs d'extraction d'acide nucléique Singuway (réf. MTQM036) avec le système automatisé Singu20 Nucleic Acid Extractor (Singuway).

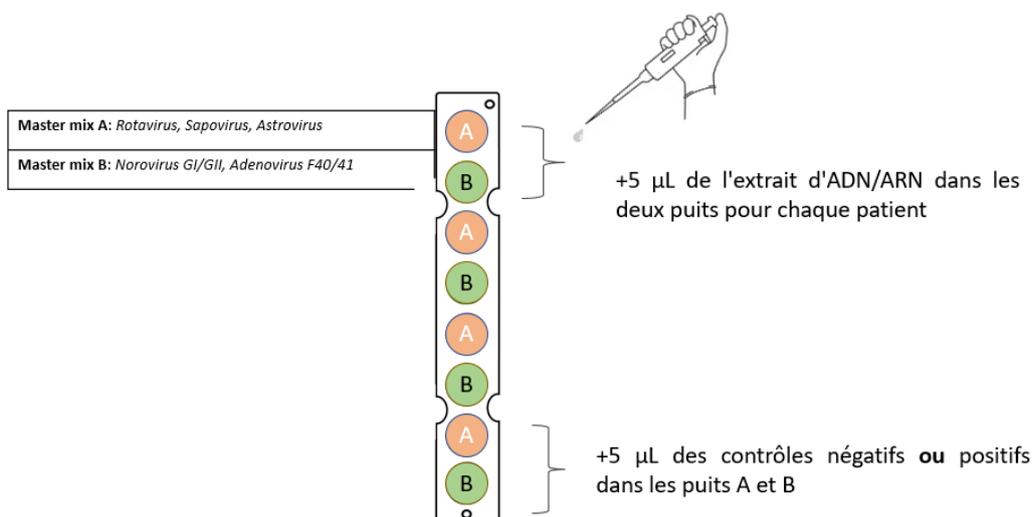
Si une autre méthode ou un autre kit d'extraction d'ADN/ARN est utilisé, veuillez effectuer votre propre méthode de validation du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology en utilisant des échantillons qualifiés positifs et négatifs complétés par le contrôle procédural de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology.

- Protocole d'amplification :

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

**Pour les microplaques pré-remplies de master mixes prêts à l'emploi (RÉF. 3150047\_SEC01 et 3150047\_SEC02) :**

1. Sortir du congélateur le nombre de barrettes ou de plaques nécessaires. Une barrette de 8 puits = 4 échantillons. Inclure des puits pour un contrôle négatif et un contrôle positif par série.
2. Centrifuger pendant 10 secondes pour éliminer les gouttelettes des parois des puits ou du film de scellage en aluminium.
3. Retirer le film de scellage en aluminium.
4. Ajouter 5 µl de contrôle négatif aux puits prévus.
5. Ajouter 5 µl d'éluat d'extraction du même échantillon dans les puits contenant les master mixes (A et B comme indiqué sur l'image ci-dessous).
6. Enfin, ajouter 5 µl de contrôle positif dans les puits prévus.
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.

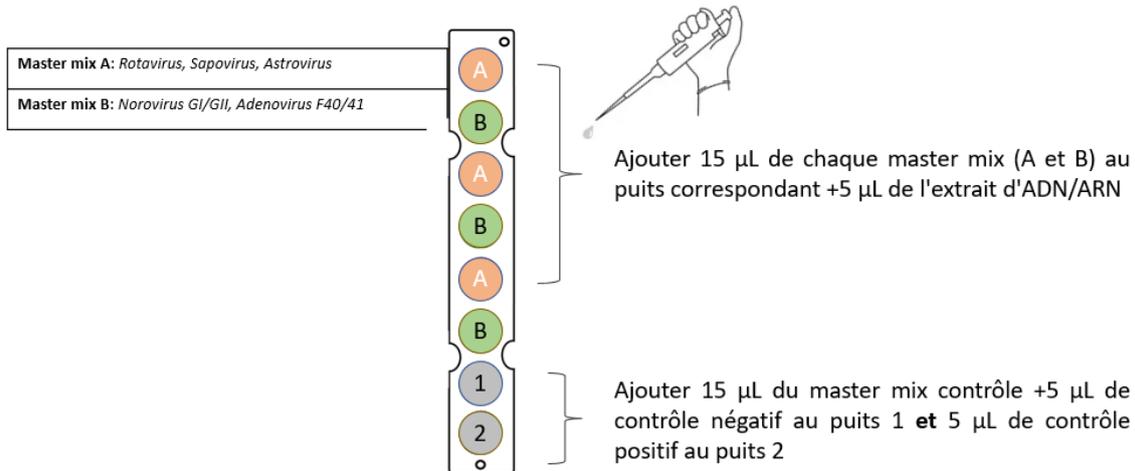


**Avec des tubes de master mixes prêts à l'emploi (RÉF. 3150047\_BLK96) :**

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 des tubes PCR ou une plaque. Chaque master mix doit être déposé dans un puits séparé. Ainsi, pour chaque patient, deux 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 contrôle.
6. Ajouter 5 µl d'éluat d'extraction du même échantillon dans les puits de réaction dédiés (master mixes A et B).
7. Enfin, ajouter 5 µl de contrôle positif dans le dernier tube/puits contenant le master mix contrôle.
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 le cône dans le volume de mélange mère. Vous pouvez également utiliser des cônes 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 l'analyse, sélectionner **Appliquer la correction de la dérive fluorescente (« Fluorescent Drift Correction »)**.

Entrer 20 µl comme volume réactionnel dans le programme du thermocycleur.

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

Paramètres des canaux de détection :

Master mix	Canal	Cible virale
<b>A</b>	FAM	<i>Rotavirus</i>
	HEX	<i>Sapovirus</i>
	TxRed	<i>Astrovirus</i>
	Cy5	Contrôle interne de l'amplification
<b>B</b>	FAM	<i>Norovirus GI/GII</i>
	HEX	<i>Adénovirus F40/41</i>
	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 limite de Cq (« Cq cut-off ») doivent également être prises en compte lors de l'interprétation des résultats.

Les interprétations des résultats et les valeurs limite 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 du master mix A. La valeur du contrôle interne doit être détectée préférentiellement avant 35 cycles ( $Cq \leq 35$ ). Néanmoins, deux situations d'absence d'amplification du contrôle interne peuvent être observées :

- Si les séquences cibles sont initialement présentes 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 séquences cibles dans les canaux FAM, HEX et Texas Red ne sont pas amplifiées, 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/ARN obtenu à 1/10
  - ou après avoir réalisé une nouvelle extraction/purification des acides nucléiques.

#### Contrôle procédural (CONTROL IP, bouchon jaune)

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

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 et/ou le prétraitement 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.

Canaux de détection							Interprétation
Master mix A				Master mix B			
FAM (NSP3)	HEX (RdRp-VP1)	TxRed (ORF1b)	Cy5 (Contrôle interne)	FAM (ORF1-ORF2)	HEX (gène hexon)	Cy5 (Contrôle procédural)	
+ Cq<41	-	-	+ Cq ≤ 35	-	-	Cq ≤ 35	Rotavirus
-	+ Cq<41	-	+ Cq ≤ 35	-	-	Cq ≤ 35	Sapovirus
-	-	+	+ Cq ≤ 35	-	-	+ Cq ≤ 35	Astrovirus
+ Cq<41	-	-	-	-	-	+ Cq ≤ 35	Rotavirus
-	+ Cq<41	-	-	-	-	+ Cq ≤ 35	Sapovirus
-	-	+	-	-	-	+ Cq ≤ 35	Astrovirus
-	-	-	-	-	-	-	Invalide
-	-	-	+ Cq ≤ 35	-	-	+ Cq ≤ 35	Négatif pour toutes les cibles
-	-	-	+ Cq ≤ 35	+	-	+ Cq ≤ 35	Norovirus GI/GII
-	-	-	+ Cq ≤ 35	+	-	-	Norovirus GI/GII
-	-	-	+ Cq ≤ 35	-	+ Cq<41	+ Cq ≤ 35	Adénovirus F40/41
-	-	-	+ Cq ≤ 35	-	+ Cq<41	-	Adénovirus F40/41

## 10. PERFORMANCES

### • Performances cliniques

Les performances cliniques du kit PCR BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology ont été déterminées dans deux études différentes :

- Étude 1 : 21 échantillons négatifs et 27 échantillons positifs d'écouvillons fécaux provenant de l'hôpital universitaire d'Amiens, en France
- Étude 2 : 50 échantillons négatifs et 395 échantillons positifs d'écouvillons fécaux provenant du laboratoire du Centre National de Référence des gastro-entérites virales, en France

Les performances cliniques déterminées de l'étude 1 :

		Qualification de l'échantillon*	
		Positif	Négatif
BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology	Positif	25**	0
	Négatif	0	23

\* Qualification de l'échantillon original par un test rapide disponible dans le commerce et portant le marquage CE. Le test rapide ayant une faible spécificité et une faible sensibilité, les résultats de qualification d'un kit de diagnostic PCR commercial portant le marquage CE ont été pris en compte en cas de divergence.

\*\* 12 échantillons sur 27 se sont révélés positifs à d'autres pathogènes viraux ou à des pathogènes supplémentaires détectés par le kit PCR AMPLIQUICK Fecal Virology et confirmés par un kit de diagnostic PCR commercial marqué CE, mais pas par le test rapide marqué CE.

Les performances cliniques déterminées de l'étude 2 :

Master mix	Cible	Vrai positif	Vrai négatif	Faux positif	Faux négatif	Sensibilité (95 % CI)	Spécificité (95 % CI)
A	Rotavirus	61	50	0	0	100 % (94,13 à 100 %)	100 % (92,89 à 100 %)
	Sapovirus	60	50	0	0	100 % (94,04 à 100 %)	100 % (92,89 à 100 %)

	<b>Astrovirus</b>	41	50	0	0	100 % (91,40 à 100 %)	100 % (92,89 à 100 %)
<b>B</b>	<b>Norovirus GI/GII</b>	173	50	0	1	99,45 % (96,84 à 99 %)	100 % (92,89 à 100 %)
	<b>Adénovirus F40/F41</b>	52	69 (21 adénovirus autres que du groupe F*)	0	1	98,25 % (89,93-99,95 %)	100 % (94,79 à 100 %)

\* 21 échantillons étaient positifs aux adénovirus autres que du groupe F mais n'ont pas été détectés par l'AMPLIQUICK Fecal Virology. Le test BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology est spécifique des sérotypes Adénovirus F40 et F41 responsables des gastroentérites.

En tenant compte des résultats des deux études cliniques, les performances cliniques revendiquées pour le kit PCR BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology sont les suivantes :

Master mix	Cible	Vrai positif	Vrai négatif	Faux positif	Faux négatif	Sensibilité (95 % CI)	Spécificité (95 % CI)
<b>A</b>	<b>Rotavirus</b>	77	73	0	0	100 % (95,32 à 100 %)	100 % (95,07 à 100 %)
	<b>Sapovirus</b>	61	50	0	0	100 % (94,13 à 100 %)	100 % (92,89 à 100 %)
	<b>Astrovirus</b>	41	50	0	0	100 % (91,40 à 100 %)	100 % (92,89 à 100 %)
<b>B</b>	<b>Norovirus GI/GII</b>	181	73	0	1	99,45 % (96,98-99,99 %)	100 % (95,07 à 100 %)
	<b>Adénovirus F40/F41</b>	56	92	0	1	98,25 % (90,61-99,96 %)	100 % (96,07 à 100 %)

\* 21 échantillons étaient positifs aux adénovirus autres que du groupe F mais n'ont pas été détectés par l'AMPLIQUICK Fecal Virology. Le test BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology est spécifique des sérotypes Adénovirus F40 et F41 responsables des gastroentérites.

- **Sensibilité analytique**

La limite de détection du kit PCR en temps réel BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology est définie comme la concentration, en nombre de copies, qui peut être détectée à 95 % dans un échantillon d'ADN/ARN spécifique à chaque cible.

**Limites de détection des échantillons d'ADN/ARN par virus ciblé :**

Les échantillons d'ARN quantifiés proviennent de Vircell (Amplirun®) pour les rotavirus et de l'ATCC pour les sapovirus, astrovirus, norovirus G1 et norovirus G2. L'échantillon d'ADN quantifié d'adénovirus provient de Vircell (Amplirun®). L'échantillon d'ADN quantifié d'adénovirus F40 n'étant pas disponible sur le marché, l'échantillon utilisé était un ADN synthétique quantifié provenant d'itdDNA (gBlock).

Les LoD<sub>95</sub> de BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology sur les échantillons d'ADN/ARN ont été statistiquement déterminées pour chaque pathogène et chaque séquence nucléique ciblée. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Master mix	Cible	LoD <sub>95</sub> (copie d'ADN/ARN/μL)	LoD <sub>95</sub> (copie d'ADN/ARN/rxn)
<b>A</b>	Rotavirus	4,39	21,95
	Sapovirus	5,07	25,35
	Astrovirus	5,32	26,6
<b>B</b>	Norovirus G1	43,77	218,85
	Norovirus G2 (souche ATCC)	2,34	11,7
	Norovirus G2 (souche Vircell)	8,34	41,7

	Adénovirus F40	1,21	6,05
	Adénovirus F41	0,43	2,15

- **Spécificité analytique**

Le modèle des oligonucléotides a été validée *in silico* par alignement BLAST. La comparaison des séquences des amorces et des sondes montre que le kit PCR BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology est spécifique pour la détection des rotavirus, sapovirus, astrovirus, norovirus G1, norovirus G2, adénovirus F40 et adénovirus F41.

#### Réactivité croisée

La spécificité du kit PCR BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology a été confirmée en testant un panel de 42 ARN et 95 ADN de différents micro-organismes. Aucune réactivité croisée n'a été détectée entre les agents pathogènes suivants :

ARN		
Coronavirus OC43	<i>Virus du chikungunya</i>	Para-influenza de type 1
Coronavirus	<i>Virus de la rubéole</i>	Para-influenza de type 2
Coronavirus SRAS (2003)	SARS-CoV-2	Para-influenza de type 3
Coxsackie de type A6	<i>Virus de la méningoencéphalite à tiques</i>	Para-influenza 4 A
Coxsackie de type B1	<i>Parainfluenza humaine 1</i>	Virus respiratoire syncytial (sous-type A)
Coxsackie de type B5	<i>Influenza A H1</i>	Virus respiratoire syncytial (sous-type B)
Virus de la dengue 1	<i>Virus de la grippe A H3</i>	Virus du Nil occidental
Virus de la dengue 2	<i>Virus de la grippe A H5</i>	Virus de la fièvre jaune
Virus de la dengue 3	<i>Virus de la grippe B</i>	Virus Zika (lignée asiatique)
Virus de la dengue 4	<i>Rougeole</i>	Virus Zika
Echovirus 5	<i>MERS-CoV</i>	-
Entérovirus 68	<i>Oreillons</i>	-
Rhinovirus	<i>Nouvelle grippe A H1N1</i>	-

ADN		
<i>Adénovirus de type c</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus (mecA+)</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Staphylococcus aureus (mecA-)</i>	<i>Neisseria meningitidis sg A</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Neisseria meningitidis sg B</i>
<i>Virus BK</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neisseria meningitidis sg C</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Papillomavirus type 16</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Papillomavirus type 18</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Parvovirus B19 (plasmide)</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Bruceella abortus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Virus varicelle-zona</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Chlamydophila psittaci</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Herpès simplex 1</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Herpès simplex 2</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>HHV-6</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>HHV-8</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Cytomégalovirus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (NDM-1)</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Enterococcus faecalis (vanB)</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Enterococcus faecium (vanA)</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Escherichia coli O111/NM</i>
<i>Virus d'Epstein-barr</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Plasmodium falciparum (souche 3D7)</i>

<i>Escherichia coli</i> (EAEC)	<i>Listeria monocytogenes</i>	ADN de <i>Campylobacter fetus</i>
<i>Escherichia coli</i> (EIEC)	<i>Moraxella catarrhalis</i>	ADN de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	<i>Mycobacterium avium</i>	Adénovirus E04
<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Adénovirus D20
<i>Escherichia coli</i> (VTEC)	<i>Mycobacterium kansasii</i>	Adénovirus B11
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Adénovirus C02
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	Adénovirus A31

### • Étude des interférences

La présence d'inhibiteurs de la PCR dans l'échantillon peut induire une interférence positive ou négative sur les résultats du test. La présence de divers inhibiteurs dans les échantillons a été testée.

Les substances énumérées ci-dessous ont été ajoutées à des échantillons positifs d'écouvillons fécaux et testées sur le BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology :

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	3 % 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	

Aucune interférence positive ou négative n'a été constatée.

### • Précision

Les données de précision dans le contexte du kit BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology ont été déterminées sur la base de quatre conditions :

- Variabilité intra-essai (répétabilité)
- Variabilité inter-jours
- Variabilité intra-opérateurs
- Variabilité inter-laboratoires
- Variabilité inter-lots

Les données de variabilité intra-test pour le kit PCR BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology ont été déterminées sur 30 tests répétés utilisant des échantillons viraux négatifs et positifs pour chaque cible virale. Les déterminations de l'écart-type (SD) et du coefficient de variation (CV) ont montré que le kit PCR AMPLIQUICK Fecal Virology est reproductible avec un CV < 5 %.

Les variabilités inter-jours, inter-opérateurs, inter-laboratoires et inter-lots ont été déterminées sur des tests en double à partir de concentrations moyennes et faibles d'échantillons viraux positifs. Les résultats d'AMPLIQUICK Fecal Virology sont reproductibles avec un CV < 5 %.

Variabilité des rotavirus	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	28,80	0,16	0,56 %	35,84	0,34	0,96 %
Inter-jours	28,44	0,41	1,46 %	33,58	0,42	1,27 %
Inter-opérateurs	28,55	0,16	0,56 %	34,67	0,82	2,37 %
Inter-laboratoires	28,45	0,15	0,53 %	34,18	0,28	0,83 %
Inter-lots	28,63	0,17	0,60 %	36,25	0,32	0,89 %

Variabilité des sapovirus	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	27,17	0,37	1,37 %	34,39	0,46	1,33 %
Inter-jours	28,72	0,48	1,68 %	37,43	0,66	1,76 %
Inter-opérateurs	28,76	0,25	0,89 %	37,23	0,23	0,61 %
Inter-laboratoires	28,65	0,12	0,42 %	38,38	1,17	3,04 %
Inter-lots	27,92	0,21	0,75 %	35,44	0,46	1,29 %

Variabilité des astrovirus	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	28,83	0,30	1,05 %	36,22	0,49	1,34 %
Inter-jours	28,05	0,53	1,90 %	36,83	0,48	1,29 %
Inter-opérateurs	28,66	0,23	0,79 %	37,33	0,27	0,71 %
Inter-laboratoires	28,1	0,15	0,53 %	37,19	0,31	0,85 %
Inter-lots	27,73	0,08	0,28 %	35,00	0,21	0,60 %

Variabilité des norovirus GI	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	28,10	0,18	0,64 %	36,29	0,78	2,15 %
Inter-jours	28,16	0,68	2,40 %	31,80	0,48	1,52 %
Inter-opérateurs	28,31	0,91	3,21 %	31,82	1,17	3,67 %
Inter-laboratoires	28,01	0,12	0,44 %	32,17	0,14	0,43 %
Inter-lots	29,19	0,74	2,52 %	35,33	0,87	2,47 %

Variabilité des norovirus GII	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	28,26	0,40	1,40 %	36,80	0,53	1,45 %
Inter-jours	27,33	0,49	1,79 %	35,50	0,99	2,78 %
Inter-opérateurs	28,07	0,14	0,52 %	35,79	0,76	2,11 %
Inter-laboratoires	27,37	0,02	0,06 %	36,54	0,43	1,18 %
Inter-lots	28,86	1,09	3,79 %	37,37	1,16	3,11 %

Variabilité des adénovirus F40	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	24,92	0,48	1,93 %	34,63	0,56	1,62 %
Inter-jours	25,73	0,31	1,20 %	35,77	0,68	1,90 %
Inter-opérateurs	26,05	0,15	0,57 %	35,86	0,72	2,00 %
Inter-laboratoires	25,37	0,10	0,40 %	34,93	0,02	0,05 %
Inter-lots	26,80	0,59	2,21 %	35,33	0,63	1,78 %

Variabilité des adénovirus F41	Concentration « moyenne » de l'échantillon			Concentration « faible » de l'échantillon		
	Moyenne Cq	SD	CV	Moyenne Cq	SD	CV
Intra-essai	24,14	0,27	1,11 %	35,01	0,68	1,95 %
Inter-jours	25,88	0,40	1,53 %	35,54	0,09	0,24 %
Inter-opérateurs	26,14	0,59	2,27 %	35,75	0,12	0,33 %
Inter-laboratoires	25,46	0,01	0,04 %	36,11	0,89	2,46 %
Inter-lots	26,93	0,44	1,64 %	36,18	0,68	1,88 %

## 11. LIMITES

- Le non-respect de l'une 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 les norovirus GI et GII car ces derniers sont détectés dans le même canal fluorescent.
- Ce test ne permet pas de différencier les adénovirus F40 et F41 car ces derniers sont détectés 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). Comme pour tous les tests diagnostiques, les résultats doivent être interprétés en fonction des autres informations cliniques dont dispose le médecin.

## 12. BIBLIOGRAPHIE

1. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
2. <https://www.who.int/fr/publications/m/item/vaccine-preventable-diseases-surveillance-standards-rotavirus>
3. Bányai, K., Estes, M.K., Martella, V., and Parashar, U.D. (2018). Viral gastroenteritis. The Lancet 392, 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0).
4. Corcoran, M.S., van Well, G.T.J., and van Loo, I.H.M. (2014). Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33, 1663–1673. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2135-6>

## 13. SYMBOLES INTERNATIONAUX

	Consulter la notice d'utilisation ou la notice d'utilisation électronique		Contient suffisamment pour <n> tests
	Référence catalogue		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Limites de température		Date de péremption
	Fabricant		Numéro de lot
	Mandataire 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		Garder à l'abri de la lumière du soleil
	Master mix		Barrettes de bouchons
	Microplaque		Détection qualitative par PCR
	Ne pas réutiliser		Importateur

## 14. INFORMATIONS FABRICANT



**BIO SYNEX S.A.**  
22 boulevard Sébastien Brant  
67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France  
Standard :  
Tel : +33 3 88 78 78 87  
[www.biosynex.com](http://www.biosynex.com)  
Contacts France :  
Tel.: +33 3 88 77 57 00  
[service.clients@biosynex.com](mailto:service.clients@biosynex.com)  
Contacts autres pays :  
Tel. : +33 3 88 77 57 52  
[sales@biosynex.com](mailto:sales@biosynex.com)  
SAV :  
Tel : +33 3 88 77 57 25  
[Tech.support@biosynex.com](mailto:Tech.support@biosynex.com)

CH REP

**BIO SYNEX SWISS S.A.**  
Route de Rossemaison 100  
2800 DELEMONT - Suisse

## 15. HISTORIQUE DES MODIFICATIONS

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

## BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology

QUALITATIVE DETECTION OF GASTROINTESTINAL VIRUSES FROM STOOL SAMPLES.

*In vitro* diagnostic medical device for professional use.

**REF** 3150047\_SEC01 / 3150047\_SEC02 / 3150047\_BLK96

### 1. INTENDED PURPOSE

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology is a molecular *in vitro* diagnostic test for the qualitative detection by RT-qPCR of the presence of gastrointestinal viruses: Rotavirus, Sapovirus, Astrovirus, Norovirus GI/GII and Adenovirus F40/41 in human stool samples. The test is an aid in the diagnosis of viral gastroenteritis performed using a purified DNA/RNA 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 Bacteriology test (ref. 3150046 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<sup>1</sup>. 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.

Viruses commonly associated with gastroenteritis are Rotavirus, Sapovirus, Astrovirus, Norovirus and Adenovirus.

Rotaviruses are the most common cause of diarrhea in children worldwide<sup>2</sup>. These non-enveloped viruses consist of three concentric capsids that encompass a double-stranded RNA genome. There are 10 different species of Rotavirus (species A-J) with species A being the most prevalent in gastrointestinal infections.

Sapoviruses are associated with less than 5% of gastroenteritis cases worldwide. They are non-enveloped, small (30-38 nm), single-stranded RNA viruses classified in 5 different genogroups (GI-GV).

Astroviruses are small non-enveloped single-stranded RNA viruses classified into 8 different genotypes. The infection with Astroviruses is very common as an important proportion of the population carries antibodies against type1 Astrovirus.

Noroviruses are single-stranded RNA viruses with relatively small genome. These viruses are divided into 5 different genogroups (GI-GV): the GI, GII and GIV are known to infect humans. The GI and GII are the most associated genogroups with gastroenteritis. Around 685 million cases of Noroviruses are detected every year.

Adenoviruses are the third most common cause of gastrointestinal infections in children (9% of children with gastroenteritis). They are medium-sized 70-90 nm, non-enveloped viruses consisting of icosahedral nucleocapsid containing a double-stranded DNA genome (26-45 Kbp). There are 88 different Human Adenovirus types that are grouped into 7 species (A to G). F40 and F41 are the most common serotypes of Adenoviruses found in feces of patients.<sup>3,4</sup>

### 3. TEST PRINCIPLE

The AMPLIQUICK Fecal Virology test uses a single PCR (Polymerase Chain Reaction) step to simultaneously amplify and detect a specific region of the viral genome of Rotavirus, Sapovirus, Astrovirus, Norovirus, Adenovirus, an exogenous CIEZ internal control and an exogenous Rp49 control in process. The test is composed of 2 different master mixes: Mix A which targets the detection of Rotavirus, Sapovirus and Astrovirus and Mix B which targets the detection of Norovirus GI/GII and Adenovirus F40/41.

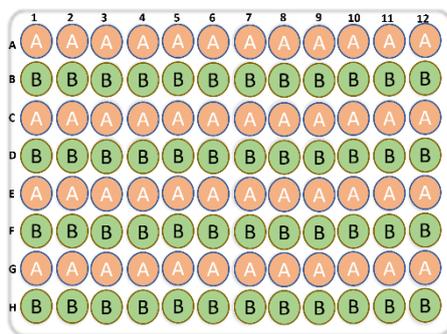
The test is based on real-time reverse transcription Polymerase Chain Reaction (PCR) technology by fluorescent probe hydrolysis. This method uses probes labelled with the fluorophores FAM, HEX and Texas Red for the

amplification of viral sequences and probes labelled with the fluorophore Cy5 for the detection of the sequences used as controls CIEZ and Rp49. It should be noted that 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 viral 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 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.

BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology is available in two formats:

- In bulk tubes (ref. 3150047\_BLK96): each master mix is provided in a microtube for the user to dispense in PCR plates.
- In prefilled microplates (ref. 3150047\_SEC01 and 3150047\_SEC02): the master mixes are distributed in the wells of a PCR plate according to order shown below.



Regardless the packaging, the Master mixes are ready-to-use and contains dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, primers and fluorescent probes, Taq polymerase enzyme, reverse transcriptase and reaction buffer.

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

#### 4. REQUIRED MATERIAL

3150047_SEC01	3150047_SEC02	3150047_BLK96
<b>Kit composition</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 dividable microplates with 96 wells format for use with 0.1 mL low-profile (SEC01)/ 0.2 mL (SEC02) high-profile thermal cycler</li> <li>- 1 tube of positive control (CONTROL+, red cap)</li> <li>- 1 tube of negative control (CONTROL-, green cap)</li> <li>- 2 tubes of control in process (CONTROL IP, yellow cap)</li> <li>- 1 tube of control master mix (CONTROL Mmix, blue cap)</li> <li>- 2 bags with 12x8 wells strips of caps</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 tubes of Master MIX A (Mmix A, white cap marked V1)</li> <li>- 4 tubes of Master MIX B (Mmix B, white cap marked V2)</li> <li>- 1 tube of positive control (CONTROL+, red cap)</li> <li>- 1 tube of negative control (CONTROL-, green cap)</li> <li>- 2 tubes of control in process (CONTROL IP, yellow cap)</li> <li>- 1 tube of control Master Mix (CONTROL Mmix, blue cap)</li> </ul>

Material required but not provided	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) or FecalSwab® (Copan) transport medium (ref. 470CE)</li> <li>- DNA/RNA extraction kit</li> <li>- Powder-free disposable gloves</li> <li>- Pipettes and filtered tips</li> <li>- qPCR Thermal Cycler</li> <li>- PCR microplate or microtubes centrifuge</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Pretreatment (ref. 3150065) or FecalSwab® (Copan) transport medium (ref. 470CE)</li> <li>- DNA/RNA extraction kit</li> <li>- Powder-free disposable gloves</li> <li>- Pipettes and filtered tips</li> <li>- qPCR Thermal Cycler</li> <li>- PCR plates or tube strips + films or optical sealing caps</li> <li>- PCR microplate or microtubes centrifuge</li> </ul>

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
3150047_SEC01	0.1mL low profile
3150047_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, TexasRed 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 cyclers:

- 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 Virology 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/RNA 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 \_SEC01 and \_SEC02: Do not use the test if the 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 the PCR strips before opening; open each PCR strip individually and rapidly close it after usage. Do not open several PCR strips simultaneously to avoid any cross-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 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 experiment 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 Virology, 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 Control Master mix can undergo 16 freeze-thaw cycles and the Master mixes in bulk format (\_BLK96) can undergo 10 freeze-thaw cycles without the shelf-life and qualities of the product being altered. The controls (including the control in process) 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 pre-filled kit format. As the plates and strips are ready to use, there is no need for repeated thaw/freeze cycles.

## 7. SAMPLE 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).

For samples in FecalSwab™: the Control in process can be added ahead of time. The fecal swab samples discharged in the transport medium and supplemented with the AMPLIQUICK Fecal Virology control in process can be stored up to 72 hours at room temperature or at 4°C and up to 1 week between -20°C and -80°C before proceeding to the nucleic acid extraction and testing with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology PCR detection kit.

## 8. TEST PROCEDURE

### 1. Sample preparation:

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

### 2. Extraction of nucleic acids:

The nucleic acids extraction must be performed before the amplification pcol using a suitable extraction system for viral DNA/RNA. 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 Virology kit has been validated with the following extraction kits:

- Macherey-Nagel NucleoMag® Dx Pathogen ref 744215 using the Magnetapure automation system provided by Dutscher
- QIAGEN QIAampFAST DNA Stool Mini Kit (ref. 51604)

- Singuway Nucleic Acid Extraction Reagents (ref. MTQM036) with the Singu20 Nucleic Acid Extractor Automated System (Singuway).

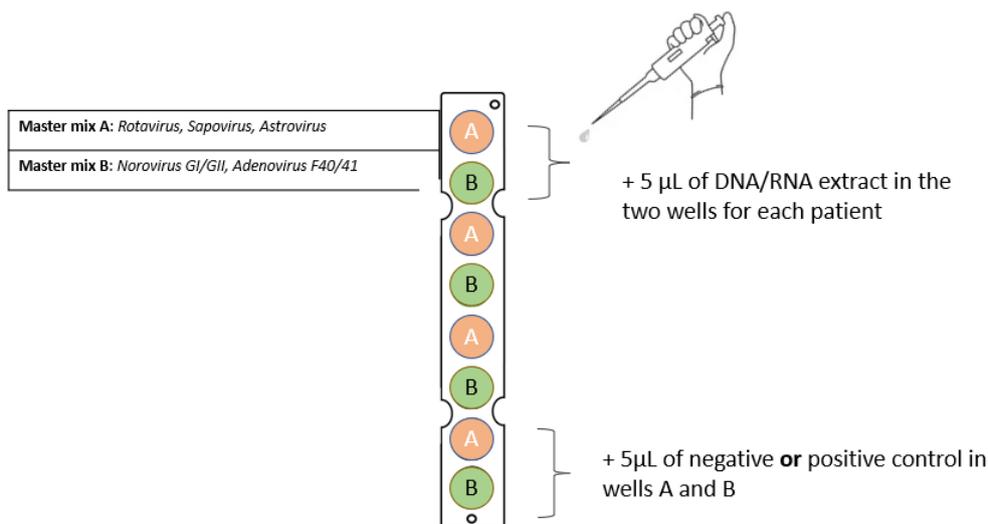
If another DNA/RNA extraction method or kit is used, please perform your own validation method of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology kit using positive and negative qualified samples supplemented with the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology control in process.

- 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 3150047\_SEC01 & 3150047\_SEC02):**

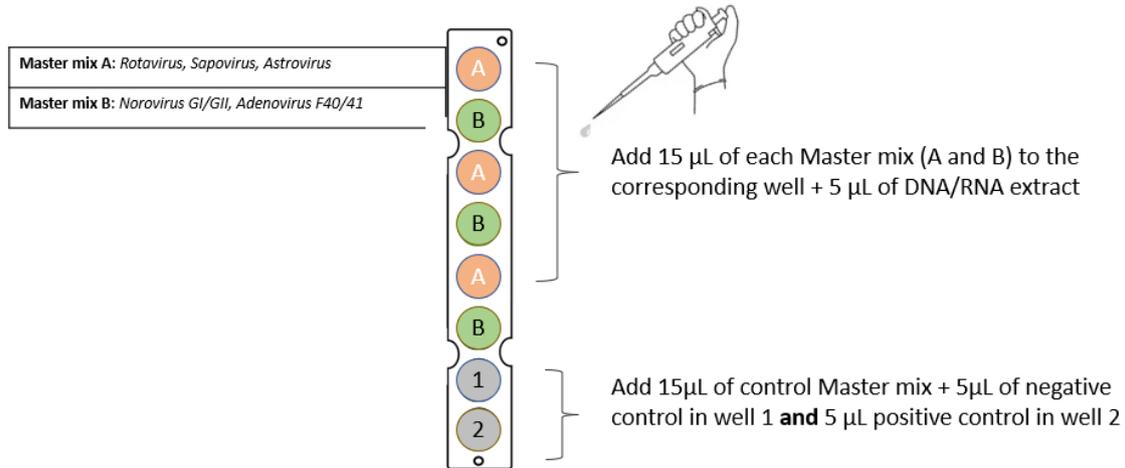
1. Take from the freezer the number of strips or plates needed. One-8wells strip = 4 samples. Include wells for one negative control and one positive control per run.
2. Centrifuge for 10 seconds to remove any droplets from the walls of the wells or the aluminum sealing foil.
3. Remove the aluminum sealing foil.
4. Add 5  $\mu$ L of negative control to the intended wells.
5. Add 5  $\mu$ L of extraction eluate from the same sample into the wells containing the master mixes (A and B as shown on below picture).
6. Finally, add 5  $\mu$ L of positive control to the intended wells.
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 ready-to-use master mixes (REF 3150047\_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  $\mu$ L of each Master mix into PCR tubes or plate. Each Master Mix must be deposited in a separate well. So, for each patient, 2 wells enable a diagnosis over the entire panel.
4. Dispense 15  $\mu$ L of control master mix in two empty wells for the controls.
5. Add 5  $\mu$ L of negative control to one of the tubes/wells containing the control master mix.
6. Add 5  $\mu$ L of extraction eluate from the same sample to the dedicated reaction wells (Master mixes A and B).
7. Finally, add 5  $\mu$ L of positive control in the last tube/well containing the control master mix.
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 analyse, please, select **Apply fluorescent drift correction**.

Enter 20 µL as the reaction volume into the Thermal Cycler program.

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

Detection channels settings :

Master mixes	Channel	Targeted Virus
<b>A</b>	FAM	<i>Rotavirus</i>
	HEX	<i>Sapovirus</i>
	TxRed	<i>Astrovirus</i>
	Cy5	Internal amplification control
<b>B</b>	FAM	<i>Norovirus GI/GII</i>
	HEX	<i>Adenovirus F40/41</i>
	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 mix A. The internal control value must preferentially be detected before 35 cycles (Cq ≤ 35). Nevertheless, two situations of lack of amplification of the internal control can be observed:

- If the target sequences 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 sequences 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/RNA 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 Master mix B. This procedural control validates the quality of the biological sample collection and validates the DNA/RNA 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 ≤ 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.

Detection channels							Interpretation
Master mix A				Master mix B			
FAM (NSP3)	HEX (RdRp-VP1)	TxRed (ORF1b)	Cy5 (Internal control)	FAM (ORF1-ORF2)	HEX (hexon gene)	Cy5 (Control in process)	
+ Cq<41	-	-	+ Cq ≤ 35	-	-	Cq ≤ 35	Rotavirus
-	+ Cq<41	-	+ Cq ≤ 35	-	-	Cq ≤ 35	Sapovirus
-	-	+	+ Cq ≤ 35	-	-	+ Cq ≤ 35	Astrovirus
+ Cq<41	-	-	-	-	-	+ Cq ≤ 35	Rotavirus
-	+ Cq<41	-	-	-	-	+ Cq ≤ 35	Sapovirus
-	-	+	-	-	-	+ Cq ≤ 35	Astrovirus
-	-	-	-	-	-	-	Invalid
-	-	-	+ Cq ≤ 35	-	-	+ Cq ≤ 35	Negative for all targets
-	-	-	+ Cq ≤ 35	+	-	+ Cq ≤ 35	Norovirus GI/GII
-	-	-	+ Cq ≤ 35	+	-	-	Norovirus GI/GII

-	-	-	+ Cq ≤ 35	-	+ Cq<41	+ Cq ≤ 35	Adenovirus F40/41
-	-	-	+ Cq ≤ 35	-	+ Cq<41	-	Adenovirus F40/41

## 10. PERFORMANCES

### • Clinical performance

The clinical performances of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit were determined in two different studies:

- Study 1: 21 negative and 27 positive fecal swab samples from the University Hospital of Amiens, France
- Study 2: 50 negative and 395 positive fecal swab samples at the French National Reference Center of viral gastroenteritis laboratory

The determined clinical performances from Study 1:

		Sample Qualification*	
		Positive	Negative
BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology	Positive	25**	0
	Negative	0	23

\*Original Sample Qualification by a CE marked commercially available rapid test. As the rapid test has a low specificity and a low sensitivity, the qualification results of a CE marked commercially available PCR diagnostic kit were considered in case of discrepancies.

\*\*12 out of 27 samples were found positive to others or additional viral pathogens detected by the AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit and confirmed by a CE marked commercially available PCR diagnostic kit but not by the CE marked rapid test.

The determined clinical performances from Study 2:

Master Mix	Target	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
A	Rotavirus	61	50	0	0	100% (94.13-100%)	100% (92.89-100%)
	Sapovirus	60	50	0	0	100% (94.04-100%)	100% (92.89-100%)
	Astrovirus	41	50	0	0	100% (91.40-100%)	100% (92.89-100%)
B	Norovirus GI/GII	173	50	0	1	99.45% (96.84-99%)	100% (92.89-100%)
	Adenovirus F40/F41	52	69 (21 non-F Adenovirus*)	0	1	98.25% (89.93-99.95%)	100% (94.79-100%)

\*21 samples were positive to non-F Adenoviruses but were not detected by the AMPLIQUICK Fecal Virology. The BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology is specific to Adenovirus F40 and F41 serotypes responsible for gastroenteritis.

After combining the results from both clinical studies, the claimed clinical performances for the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit are:

Master Mix	Target	True Positive	True Negative	False Positive	False Negative	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
A	Rotavirus	77	73	0	0	100% (95,32-100%)	100% (95,07-100%)
	Sapovirus	61	50	0	0	100% (94,13-100%)	100% (92,89-100%)
	Astrovirus	41	50	0	0	100% (91,40-100%)	100% (92,89-100%)
B	Norovirus GI/GII	181	73	0	1	99,45% (96,98-99,99%)	100% (95,07-100%)
	Adenovirus F40/F41	56	92	0	1	98,25% (90,61-99,96%)	100% (96,07-100%)

\*21 samples were positive to non-F Adenoviruses but were not detected by the AMPLIQUICK Fecal Virology. The BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology is specific to Adenovirus F40 and F41 serotypes responsible for gastroenteritis.

- Analytical Sensitivity**

The detection limit of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology Real-Time PCR Kit is defined as the concentration, in number of copies, that can be 95% detected in a DNA/RNA sample specific to each target.

**Detection limits on DNA/RNA samples per targeted virus:**

Quantified RNA samples were purchased from Vircell (Amplirun®) for Rotavirus and from ATCC for Sapovirus, Astrovirus, Norovirus G1 and Norovirus G2. Quantified Adenovirus F41 DNA sample was purchased from Vircell (Amplirun®). Quantified Adenovirus F40 DNA sample is not available on the market and therefore the sample used was a quantified synthetic DNA purchased from idtDNA (gBlock).

The LoD<sub>95</sub> of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology on DNA/RNA samples was statistically determined for each pathogen and targeted nucleic sequence. Results are given in the table below:

Master mix	Target	LoD <sub>95</sub> (DNA/RNA copy/μL)	LoD <sub>95</sub> (DNA/RNA copy/rxn)
A	Rotavirus	4.39	21.95
	Sapovirus	5.07	25.35
	Astrovirus	5.32	26.6
B	Norovirus G1	43.77	218.85
	Norovirus G2 (ATCC strain)	2.34	11.7
	Norovirus G2 (Vircell strain)	8.34	41.7
	Adenovirus F40	1.21	6.05
	Adenovirus F41	0.43	2.15

- Analytical Specificity**

The design of oligonucleotides was validated *in silico* by BLAST alignment. The comparison of the primers and probes sequences shows that the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit is specific to the detection of Rotaviruses, Sapovirus, Astrovirus, Norovirus G1, Norovirus G2, Adenovirus F40 and Adenovirus F41.

**Cross-reactivity**

The specificity of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit was confirmed by testing a panel of 42 RNA and 95 DNA of different microorganisms. No cross-reactivity was detected between any of the following pathogens:

RNA		
Coronavirus OC43	<i>Chikungunya virus</i>	Parainfluenza 1
Coronavirus	<i>Rubella virus</i>	Parainfluenza 2
Coronavirus SARS (2003)	SARS-CoV-2	Parainfluenza 3
Coxsackie A6	<i>Tick-borne-encephalitis virus</i>	Parainfluenza 4 A
Coxsackie B1	<i>Human parainfluenza 1</i>	Respiratory syncytial virus (subtype A)
Coxsackie B5	<i>Influenza A H1</i>	Respiratory syncytial virus (subtype B)
Dengue 1 virus	<i>Influenza A H3</i>	West Nile virus
Dengue 2 virus	<i>Influenza A H5</i>	Yellow fever virus
Dengue 3 virus	<i>Influenza B</i>	Zika virus (Asian lineage)
Dengue 4 virus	<i>Measles</i>	Zika virus
Echovirus 5	<i>MERS-CoV</i>	-
Enterovirus 68	<i>Mumps</i>	-
Rhinovirus	<i>Novel influenza A H1N1</i>	-

DNA		
<i>Adenovirus c-type</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus (mecA+)</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Staphylococcus aureus (mecA-)</i>	<i>Neisseria meningitidis sg A</i>
<i>Bartonella quintana</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Neisseria meningitidis sg B</i>
<i>BK virus</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neisseria meningitidis sg C</i>
<i>Bordetella holmesii</i>	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Papillomavirus type 16</i>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Papillomavirus type 18</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Parvovirus B19 (plasmid)</i>
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Varicella-zoster virus</i>	<i>Aeromonas caviae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Aeromonas dhakensis</i>
<i>Candida auris</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Aeromonas veronii</i>
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Herpes simplex 1</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Herpes simplex 2</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>HHV-6</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>HHV-8</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae (NDM-1)</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Enterococcus faecalis (vanB)</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>Enterococcus faecium (vanA)</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Escherichia coli O111/NM</i>
<i>Epstein-barr virus</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Plasmodium falciparum Strain 3D7</i>
<i>Escherichia coli (EAEC)</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Campylobacter fetus DNA</i>
<i>Escherichia coli (EIEC)</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis DNA</i>
<i>Escherichia coli (EPEC)</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Adenovirus E04</i>
<i>Escherichia coli (ETEC)</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Adenovirus D20</i>
<i>Escherichia coli (VTEC)</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Adenovirus B11</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Adenovirus C02</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	<i>Adenovirus A31</i>

- **Interference Study**

The presence of PCR inhibitors in the sample may induce a positive or negative interference on test results. The presence of various inhibitors in samples was tested.

The substances listed below were supplemented to fecal swab positive samples and tested on the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology:

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	3% 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	

No positive or negative interference was found.

- **Precision**

The precision data in the context of the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology kit was determined based on 4 conditions:

- Intra-assay variability
- Inter-days variability
- Inter-operators variability
- Inter-laboratories variability
- Inter-batches variability

Intra-assay variability data for the BIOSYNEX AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit was determined on 30 replicate tests using negative and positive viral samples for each viral target. The Standard Deviation (SD) and Coefficient Variation (CV) determinations showed that the AMPLIQUICK Fecal Virology PCR kit is repeatable with CV<5%. Inter-days, inter-operators, inter-laboratories and inter-batches variabilities were determined on duplicate tests from medium and low concentrations of positive viral samples. The AMPLIQUICK Fecal Virology results are reproducible with CV<5%.

Rotavirus variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	28.80	0.16	0.56%	35.84	0.34	0.96%
Inter-days	28.44	0.41	1.46%	33.58	0.42	1.27%
Inter-operators	28.55	0.16	0.56%	34.67	0.82	2.37%
Inter-laboratories	28.45	0.15	0.53%	34.18	0.28	0.83%
Inter-batches	28.63	0.17	0.60%	36.25	0.32	0.89%

Sapovirus variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	27.17	0.37	1.37%	34.39	0.46	1.33%
Inter-days	28.72	0.48	1.68%	37.43	0.66	1.76%
Inter-operators	28.76	0.25	0.89%	37.23	0.23	0.61%
Inter-laboratories	28.65	0.12	0.42%	38.38	1.17	3.04%
Inter-batches	27.92	0.21	0.75%	35.44	0.46	1.29%

Astrovirus variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	28.83	0.30	1.05%	36.22	0.49	1.34%
Inter-days	28.05	0.53	1.90%	36.83	0.48	1.29%
Inter-operators	28.66	0.23	0.79%	37.33	0.27	0.71%
Inter-laboratories	28.1	0.15	0.53%	37.19	0.31	0.85%
Inter-batches	27.73	0.08	0.28%	35.00	0.21	0.60%

Norovirus GI variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	28.10	0.18	0.64%	36.29	0.78	2.15%
Inter-days	28.16	0.68	2.40%	31.80	0.48	1.52%
Inter-operators	28.31	0.91	3.21%	31.82	1.17	3.67%
Inter-laboratories	28.01	0.12	0.44%	32.17	0.14	0.43%
Inter-batches	29.19	0.74	2.52%	35.33	0.87	2.47%

Norovirus GII variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	28.26	0.40	1.40%	36.80	0.53	1.45%
Inter-days	27.33	0.49	1.79%	35.50	0.99	2.78%
Inter-operators	28.07	0.14	0.52%	35.79	0.76	2.11%
Inter-laboratories	27.37	0.02	0.06%	36.54	0.43	1.18%
Inter-batches	28.86	1.09	3.79%	37.37	1.16	3.11%

Adenovirus F40 variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	24.92	0.48	1.93%	34.63	0.56	1.62%
Inter-days	25.73	0.31	1.20%	35.77	0.68	1.90%
Inter-operators	26.05	0.15	0.57%	35.86	0.72	2.00%
Inter-laboratories	25.37	0.10	0.40%	34.93	0.02	0.05%
Inter-batches	26.80	0.59	2.21%	35.33	0.63	1.78%

Adenovirus F41 variability	"Medium" Sample Concentration			"Low" Sample Concentration		
	Mean Cq	SD	CV	Mean Cq	SD	CV
Intra-assay	24.14	0.27	1.11%	35.01	0.68	1.95%
Inter-days	25.88	0.40	1.53%	35.54	0.09	0.24%
Inter-operators	26.14	0.59	2.27%	35.75	0.12	0.33%
Inter-laboratories	25.46	0.01	0.04%	36.11	0.89	2.46%
Inter-batches	26.93	0.44	1.64%	36.18	0.68	1.88%

## 11. LIMITATIONS

- Failure to follow any instruction of the IFU may adversely affect the test performance and/or invalidate the test result.
- This test cannot differentiate between Norovirus GI and GII as they are detected in the same fluorescent channel.
- This test cannot differentiate between Adenovirus F40 and F41 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). As with all diagnostic tests, results must be considered with other clinical information available to the physician.

## 12. LITERATURE

1. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
2. <https://www.who.int/fr/publications/m/item/vaccine-preventable-diseases-surveillance-standards-rotavirus>

3. Bányai, K., Estes, M.K., Martella, V., and Parashar, U.D. (2018). Viral gastroenteritis. *The Lancet* 392, 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31128-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0).
4. Corcoran, M.S., van Well, G.T.J., and van Loo, I.H.M. (2014). Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33, 1663–1673. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2135-6>.

### 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
	Temperature limits		Use-by-date
	Manufacturer		Batch code
	Authorized representative in Switzerland		Do not use if package is damaged and consult the instructions for use
	Unique device identifier		Positive control
	Negative control		Control in Process
	Control Master mix		Keep away from sunlight
	Master mix		Cap strips
	Microplate		Qualitative detection by PCR
	Do not reuse		Importer

### 14. MANUFACTURER INFORMATION



**BIO SYNEX S.A.**  
 22 boulevard Sébastien Brant  
 67400 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN – France  
 Tel : +33 3 88 78 78 87

[www.biosynex.com](http://www.biosynex.com)

Contact France:

Tel.: +33 3 88 77 57 00

[service.clients@biosynex.com](mailto:service.clients@biosynex.com)

Contact other countries :

Tel.: +33 3 88 77 57 52

[sales@biosynex.com](mailto:sales@biosynex.com)

After-sales service:

Tel: +33 3 88 77 57 25

[Tech.support@biosynex.com](mailto:Tech.support@biosynex.com)



**BIO SYNEX SWISS S.A.**  
 Route de Rossemaison 100  
 2800 DELEMONT - Switzerland

**15. HISTORIC MODIFICATION**

<b>Record version</b>	<b>Amended paragraph</b>	<b>Change details</b>
V1	All	New product, creation of the IFU