



RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel

REF PG0705



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Alemania
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA® GENE Hospital Stool Panel es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de norovirus (genogrupos I y II), rotavirus y genes de toxinas A (tcdA)/B (tcdB) de *Clostridium difficile* en muestras de heces humanas.

El ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA® GENE Hospital Stool Panel está concebido como una ayuda para el diagnóstico de la gastroenteritis adquirida en el hospital.

2. Resumen y descripción del ensayo

La diarrea intrahospitalaria (adquirida en el hospital) se define como un episodio agudo de diarrea a partir de las 72 horas de ingreso hospitalario (regla de los 3 días). Las causas de la diarrea adquirida en el hospital pueden ser infecciosas o no infecciosas (p. ej., medicación o quimioterapia), y puede llegar a afectar a la tercera parte de los pacientes hospitalizados. La causa infecciosa más frecuente de la diarrea adquirida en el hospital es *Clostridium difficile*. Aparte de *Clostridium difficile*, otras causas infecciosas predominantes son los norovirus y rotavirus. La diarrea adquirida en el hospital puede causar complicaciones graves en los pacientes, y aumenta la duración y los costos de la estancia hospitalaria.^{1,2,3,4}

Los norovirus son, con diferencia, la causa de la mayoría de los brotes de gastroenteritis no bacteriana.^{5,6,7} Una gastroenteritis causada por norovirus se manifiesta por náuseas, vómitos y diarrea importantes. Los norovirus se expulsan en las heces y los vómitos. La transmisión aérea a través de los aerosoles que contienen el virus es con frecuencia la causa de una difusión muy rápida en lugares compartidos.^{8,9,10} Los CDC (Centers for Disease Control, Atlanta, EE. UU.) calculan que más de 21 millones de casos de gastroenteritis aguda, 70 000 hospitalizaciones y 800 muertes se deben cada año a infecciones por norovirus en Estados Unidos.¹¹

Los norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae* y son virus pequeños, sin envoltura, con ARN monocatenario (ARNmc). Actualmente, se pueden agrupar en 7 genogrupos con más de 30 genotipos y multitud de subtipos («clades»). Hasta el momento, solo se han descrito patógenos humanos del genogrupo I (GI) con 9 genotipos, del genogrupo II (GII) con 22 genotipos y del genogrupo IV (GIV).^{18,19}

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* de virus de ARN bicatenario (ARNbc) icosaédricos sin envoltura, y se clasifican en 7 serogrupos (A - G). Las infecciones humanas son causadas únicamente por los serogrupos A, B y C, aunque el rotavirus serogrupo A es responsable de más del 90 % de las infecciones.¹² Los síntomas de la infección por rotavirus son por lo general vómitos, diarrea líquida y dolor abdominal. El virus se transmite por vía fecal-oral, a través de las manos y objetos contaminados. El rotavirus es la causa principal de diarrea en niños menores de cinco años y se calcula que es responsable de la muerte de unos 611 000 en todo el mundo cada año.¹³

Clostridium difficile, una bacteria anaerobia grampositiva formadora de esporas, fue descrita por primera vez en 1935 por Hall y O'Toole como un componente de la

microbiota intestinal de neonatos sanos.¹⁴ Sin embargo, a finales de la década de 1970 se identificó a *Clostridium difficile* como la causa de la diarrea asociada con el uso de antibióticos y la colitis pseudomembranosa.¹⁵ En la actualidad, *Clostridium difficile* es una de las causas más comunes de diarrea intrahospitalaria. *Clostridium difficile* es responsable del 15 % al 25 % de los casos de diarrea asociada con el uso de antibióticos y de casi todos los casos de colitis pseudomembranosa.¹⁶ Los factores de riesgo que predisponen a la DACD son, por ejemplo, la exposición a antibióticos, la edad avanzada, la cantidad de hospitalizaciones y su duración. Sin embargo, también se observa infección por *Clostridium difficile* en un número cada vez mayor de personas no hospitalizadas y no tratadas con antibióticos. Los síntomas van desde diarrea leve hasta infecciones intestinales de diversa gravedad, incluida la colitis pseudomembranosa, la forma más grave de enfermedad inflamatoria intestinal inducida por antibióticos. Los casos clínicamente sintomáticos son causados por cepas toxigénicas de *Clostridium difficile* que producen toxina A y toxina B. En los últimos años, la incidencia y la gravedad de las infecciones por *Clostridium difficile* han aumentado en todo el mundo.¹⁷

La RT-PCR en tiempo real permite la detección rápida y con alta sensibilidad y especificidad de la causa infecciosa de la diarrea. Un diagnóstico temprano y confiable del patógeno que causa la diarrea permite administrar un tratamiento específico a los pacientes hospitalizados, así como iniciar medidas de higiene para evitar la transmisión hospitalaria.

3. Principio del ensayo

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel es una prueba de diagnóstico molecular para la detección cualitativa directa y la diferenciación de norovirus (genogrupos I y II), rotavirus y genes de toxinas A (tcdA)/B (tcdB) de *Clostridium difficile* en muestras de heces humanas.

La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa va seguida de la PCR en el mismo tubo de reacción. El ARN aislado (norovirus, rotavirus) se transcribe en ADNc por la acción de la transcriptasa inversa. A continuación, los fragmentos de genes específicos de norovirus (región de unión ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3) y toxina A/B (tcdA/tcdB) de *Clostridium difficile* se amplifican por PCR en tiempo real. Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel contiene un **Internal Control RNA** (ICR) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra y para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rojo
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	café
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos contra la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).
- Los reactivos admiten hasta **20 ciclos de congelación/descongelación** sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real de RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel es adecuado para usarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataformas de extracción	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN)

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler[®] 480II y el LightCycler[®] 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0,5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN/ARN de muestras de heces humanas, use un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ácido nucleico viral siguiendo las instrucciones del fabricante. Se recomienda diluir las muestras de heces 1:3 con agua antes de la extracción. Agite intensamente en un mezclador vórtex la muestra de heces diluida y centrifúguela a 1000 x g durante 30 segundos. Use el volumen adecuado de sobrenadante según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®] GENE Hospital Stool Panel contiene un Internal Control RNA que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El Internal Control RNA puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el Internal Control RNA se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de Internal Control RNA a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control RNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control RNA** debe agregarse siempre a la mezcla de muestra y búfer de lisado, y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR de control negativo y control positivo.

9. Ejecución de la prueba

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestra: Agregue 5 µl de eluato a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de RT-PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5 y 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal de RT-PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal de RT-PCR en tiempo real en el equipo serie LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

Tabla 6: Perfil universal de RT-PCR en tiempo real de Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

Nota: El perfil universal de la PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de PCR en tiempo real de ADN RIDA® GENE y de ARN RIDA® GENE.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Toxina A/B de C. <i>difficile</i>	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	Toxina A/B de C. <i>difficile</i>	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Toxina A/B de C. <i>difficile</i>	Cy5	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Toxina A/B de C. <i>difficile</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Toxina A/B de C. <i>difficile</i>	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICR	Amarillo	
	Rotavirus	Naranja	
	Toxina A/B de C. <i>difficile</i>	Rojo	

10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8, figuras 1, 2 y 3) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 8: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

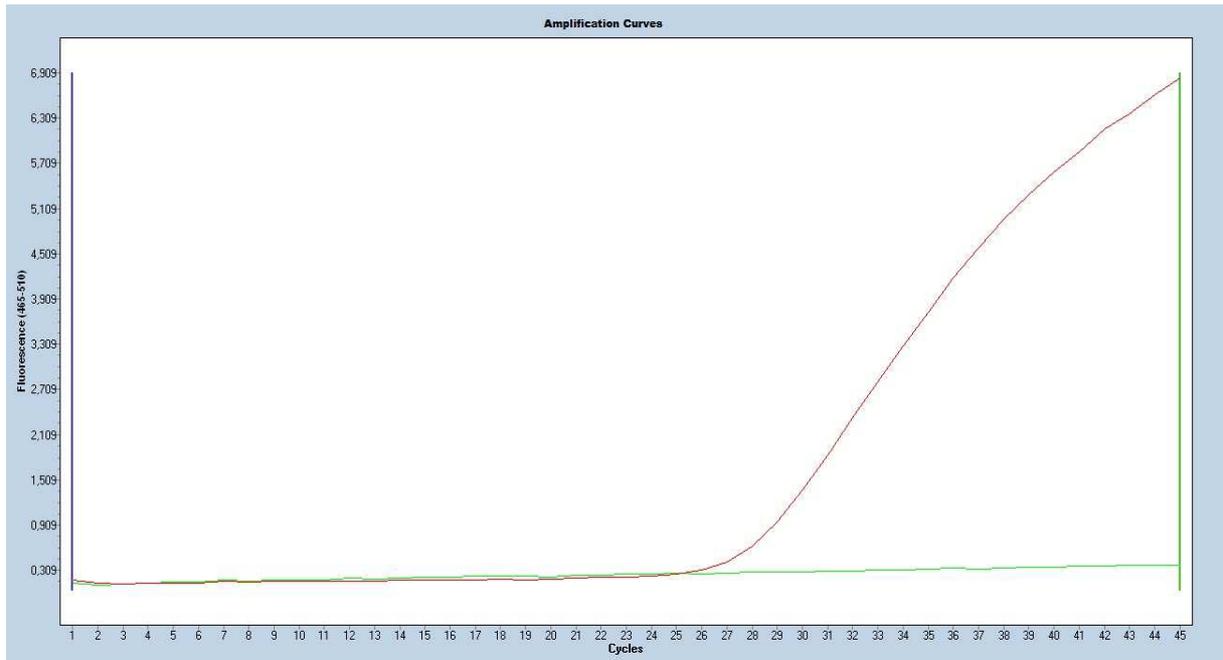


Figura 1: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (norovirus) en el LightCycler® 480II

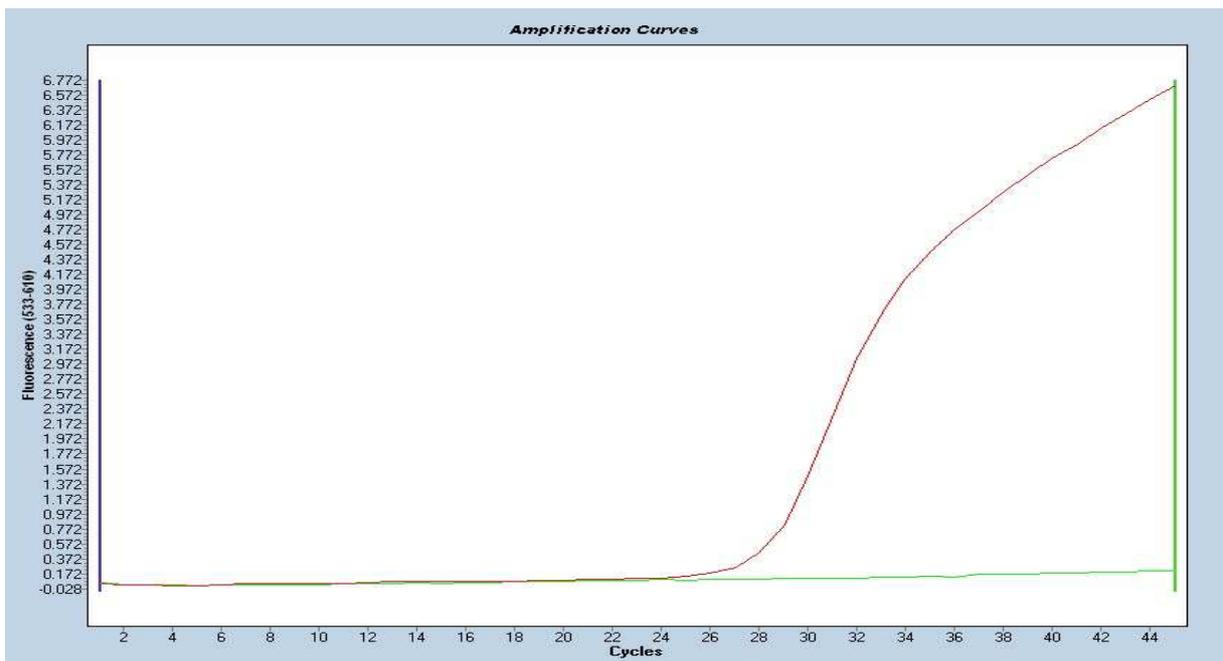


Figura 2: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (rotavirus) en el LightCycler® 480II

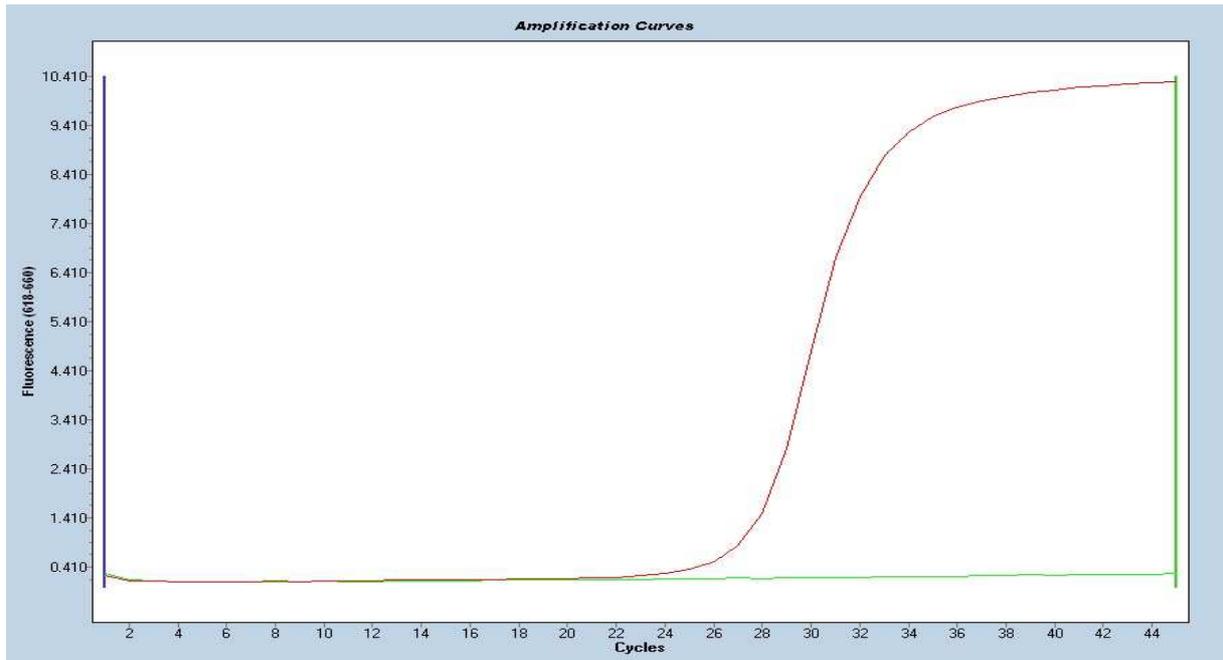


Figura 3: Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (genes de las toxinas A/B de *C. difficile*) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Detección				
Norovirus	Rotavirus	Genes de toxina A/B de <i>C. difficile</i>	ICR/ICD	Resultado
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	Norovirus detectado
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	Rotavirus detectado
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	Toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectadas
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	Norovirus y rotavirus detectados
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	Rotavirus y toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	Norovirus y toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	Norovirus, rotavirus y toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si, tanto el ARN de la muestra como el **Internal Control RNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se considera positiva si hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero no del **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La detección del **Internal Control RNA** no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del **Internal Control RNA** sea débil o esté ausente.

La muestra se considera negativa si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero hay señal de amplificación del **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del **Internal Control RNA**.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra ni del **Internal Control RNA** en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga viral en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevos genotipos de norovirus, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR in vitro, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia de los genes diana correspondientes (norovirus: región de unión ORF1/ORF2, rotavirus: gen NSP3, toxinas A/B de *Clostridium difficile*: tcdA/tcdB).
8. Los norovirus del genogrupo IV, que muy rara vez infectan a los seres humanos, también se detectan con el ensayo RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel.
9. El ensayo RIDA[®]GENE Hospital Stool Panel no detecta a los rotavirus de los serogrupos B y C.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Hospital Stool Panel tiene un límite de detección de ≥ 50 copias por reacción para norovirus, rotavirus y los genes de las toxinas A/B de *Clostridium difficile*.

Las figuras 4, 5 y 6, a continuación, muestran diluciones seriadas de norovirus, rotavirus (10^5 - 10^1 copias de ARN por μl en cada caso) y genes de las toxinas A/B de *Clostridium difficile* (10^5 - 10^1 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

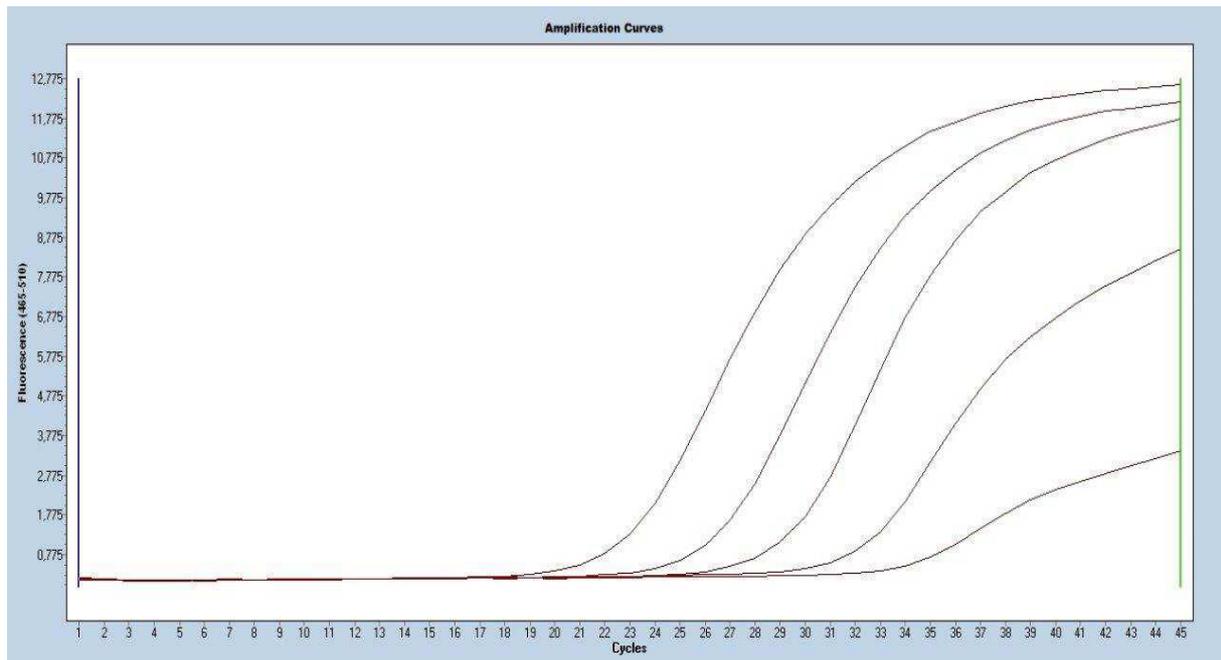


Figura 4: Dilución seriada de norovirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

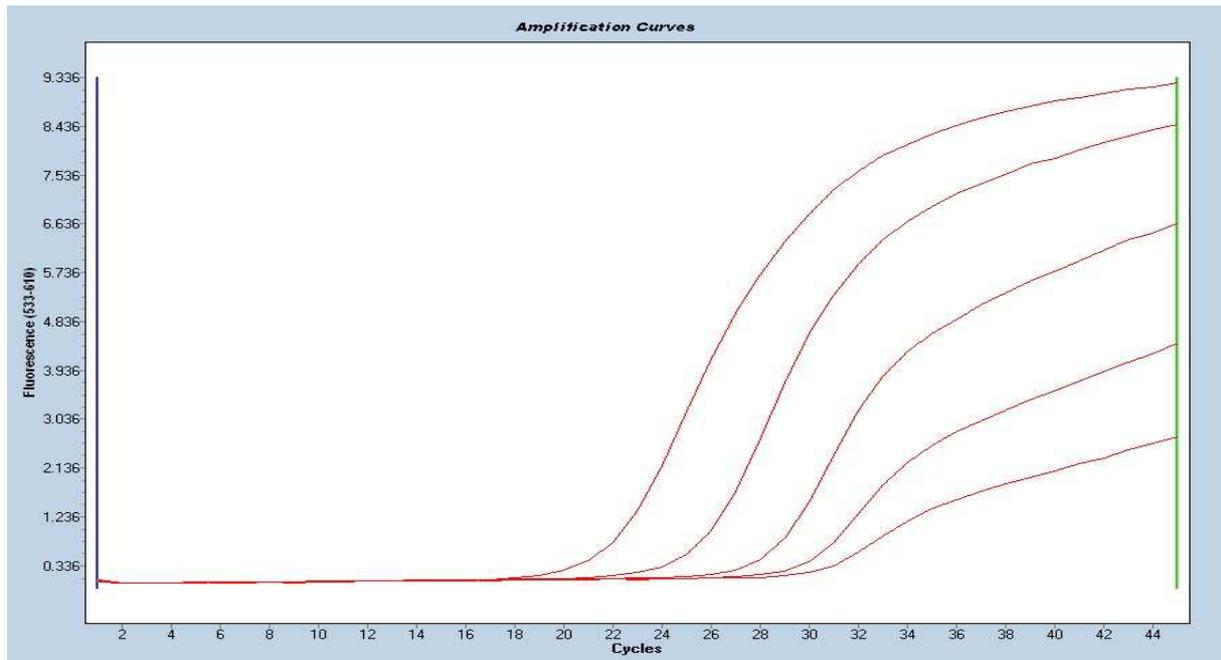


Figura 5: Dilución seriada de rotavirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

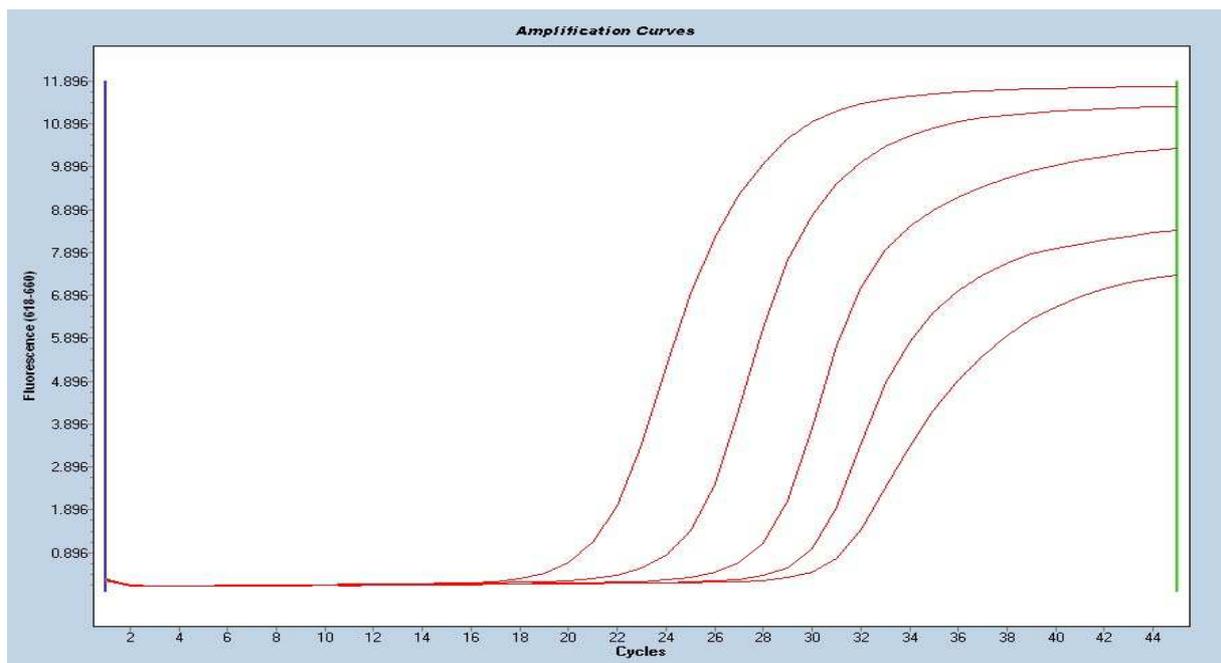


Figura 6: Dilución seriada de genes de las toxinas A/B de *Clostridium difficile* ($10^5 - 10^1$ copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción de los ácidos nucleicos y la concentración de ácidos nucleicos.

13.2 Especificidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Hospital Stool Panel es específico para norovirus (genogrupos I, II y IV), rotavirus (serogrupo A) y los genes de las toxinas A/B de *Clostridium difficile*. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 10):

Tabla 10: Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Campylobacter fetus</i> subespecie <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Hospital Stool Panel se evaluó en comparación con varios genotipos de norovirus de los genogrupos I, II y IV, y diferentes serotipos de rotavirus tipo A (consulte la tabla 11). El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Hospital Stool Panel detectó todos los genotipos de norovirus y serotipos de rotavirus del panel.

Tabla 11: Pruebas de reactividad analítica

Norovirus					
Genogrupo I					
GI.1 – Norwalk	+	GI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GI.6 – Hesse	+
GI.2 – Southhampton, Whiterose	+	GI.4 – Chiba, Malta	+	GI.7 – Winchester	+
GI.2 – Southhampton, Southhampton	+	GI.5 – Musgrove	+	GI.8 – Boxer	+
Genogrupo II					
GII.1 – Hawaii	+	GII.4 – Sydney 2012	+	GII.17 – Kawasaki	+
GII.2 – Melksham	+	GII.6 – Seacroft	+	GII.b – Hilversum	+
GII.3 – Toronto	+	GII.7 – Leeds	+	GII.c – La Haya	+
GII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+	GII.10 – Erfurt	+		
Genogrupo IV					
GIV.1 – Alpatron	+				
Rotavirus					
Serogrupo A					
Serotipo G1	+	Serotipo G2	+	Serotipo G3	+
Serotipo G4	+	Serotipo G9	+	Serotipo G12	+

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-09-20	Revisión general 2. Resumen y descripción del ensayo 4. Reactivos suministrados 5. Instrucciones de almacenamiento 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 12. Limitaciones del método 13. Características de rendimiento 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Obsérvese las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

1. Polage CR *et al.* Nosocomial Diarrhea: Evaluation and Treatment of Causes Other Than *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. 2012.
2. Bartel B *et al.* Nosocomial diarrhea: a review of pathophysiology, etiology, and treatment strategies. *Hosp Pract*. 2012; 40(1):130-138.
3. Weis S *et al.* Nosokomiale Diarrhö. *Internist* 2011; 51:167-178.
4. Pawlowski SW *et al.* Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea. *Gastroenterology* 2009 ; 136(6): 1874–1886.
5. Mead PS *et al.* Food- related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
6. Glass RJ *et al.* The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S254-261.
7. Evan HS. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1:165-171.
8. Johnston CP *et al.* Outbreak management and implications of a nosocomial Norovirus outbreak. *CID* 2007; 45:534-540.
9. Corwin AL *et al.* Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6)898-903.
10. Kaplan JE *et al.* An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home: demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982; 116:940-948.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
12. Wilhelmi I *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol infect* 2003, 9: 247-262.
13. Parashar UD *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(2): 304-306.
14. Hall IC *et al.* Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935, 49: 390–402.
15. Bartlett JG *et al.* Antibiotica-associated pseudomembranous colitis due to a toxin-producing clostridia. *N Engl J Med*, 1978; 298:531-543.
16. Bartlett JG *et al.* Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *CID* 2008, 46: S12-18.
17. Bartlett JG. Narrative Review: The new Epidemic of *Clostridium difficile* - Associated Enteric Disease. *Ann Intern Med* 2006; 145:758-764.
18. Parra GI *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017; 13(1): e1006136.

19.11. Vinjé j. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus.
J. Clin. Microbiol 2015;53(2):373-81