



## RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel

**REF** PG0705



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



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE Hospital Stool Panel est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des norovirus (génogroupes I et II), des rotavirus et de gènes des toxines A (tcdA)/B (tcdB) de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles humaines.

Le test de RT-PCR en temps réel RIDA®GENE Hospital Stool Panel est destiné à faciliter le diagnostic des infections gastro-intestinales nosocomiales.

## 2. Résumé et explication du test

La diarrhée nosocomiale, ou contractée au sein d'un établissement hospitalier, est définie comme un épisode de diarrhée aigu survenant 72 heures après le début de l'hospitalisation (règle des 3 jours). La diarrhée nosocomiale peut être d'origine infectieuse ou non infectieuse (par ex., médicament ou chimiothérapie) et touche jusqu'à un tiers des patients hospitalisés. La cause infectieuse la plus courante de la diarrhée nosocomiale est *Clostridium difficile*. Mis à part *Clostridium difficile*, d'autres causes infectieuses prédominantes sont les norovirus et les rotavirus. La diarrhée nosocomiale peut entraîner des complications graves chez les patients et augmenter la durée et le coût de l'hospitalisation<sup>1,2,3,4</sup>.

Les norovirus sont de loin les agents infectieux qui provoquent le plus grand nombre d'épidémies de gastroentérite non bactérienne<sup>5,6,7</sup>. Une gastroentérite causée par norovirus se manifeste par de sévères nausées, des vomissements et de la diarrhée. Les Norovirus sont expulsés dans les selles et les vomissements. La maladie se propage souvent très rapidement dans les établissements collectifs du fait de la transmission aérienne d'aérosols contenant le virus<sup>8,9,10</sup>. Le Centre de contrôle des maladies (CDC, Atlanta, États-Unis) estime que, chaque année, plus de 21 millions de cas de gastroentérite aiguë, 70 000 hospitalisations et 800 décès sont provoqués par des infections à norovirus aux États-Unis<sup>11</sup>. Les norovirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae* et sont de petits virus sans enveloppe à ARN simple brin (ARNsb). Ils peuvent être regroupés en 7 génogroupes comptant actuellement plus de 30 génotypes et de nombreux clades. À ce jour, les agents pathogènes pour l'homme appartiennent uniquement au génogroupe I (GI) qui compte 9 génotypes, au génogroupe II (GII) qui compte 22 génotypes et au génogroupe IV (GIV)<sup>18,19</sup>.

Les rotavirus appartiennent à la famille des Reoviridae de virus sans enveloppe, de structure icosaédrique et à ARN double brin (ARNdb). Ils sont classés en 7 sérogroupes (A à G). Chez l'homme, les infections sont uniquement provoquées par les sérogroupes A, B et C, même si le séro groupe A est responsable de plus de 90 % des infections<sup>12</sup>. Les symptômes d'une infection par rotavirus sont généralement vomissements, diarrhée liquide et douleurs abdominales. Le virus est transmis par voie oro-fécale par le biais de mains et d'objets contaminés. Le rotavirus est la principale cause de diarrhée chez les enfants âgés de moins de cinq ans et responsable du décès d'environ 611 000 enfants dans le monde entier selon les estimations<sup>13</sup>.

*Clostridium difficile*, bactérie anaérobie, à Gram positif et génératrice de spores fut décrite pour la première fois en 1935 par Hall et O'Toole comme un composant de la microflore intestinale de nourrissons sains<sup>14</sup>. Cependant, vers la fin des années 1970, *Clostridium difficile* fut identifiée comme étant la cause de diarrhée associée aux antibiotiques et de la colite pseudo-membraneuse<sup>15</sup>. De nos jours, *Clostridium difficile* est l'une des causes les plus courantes de diarrhée nosocomiale. *Clostridium difficile* est responsable de 15 à 25 % des cas de diarrhée associée aux antibiotiques et de quasiment tous les cas de colite pseudo-membraneuse<sup>16</sup>. Les facteurs de risque de la CDAD sont, par exemple, l'exposition aux antibiotiques, l'âge avancé et le nombre et la durée des hospitalisations. Cependant, les infections par *Clostridium difficile* surviennent aussi chez un nombre croissant de personnes non traitées par antibiotiques et non hospitalisées. Les symptômes vont d'une légère diarrhée à des infections intestinales de sévérité variable, notamment la colite pseudo-membraneuse, forme la plus grave de maladie intestinale induite par les antibiotiques. Les cas cliniquement symptomatiques sont provoqués par des souches toxigènes de *Clostridium difficile* qui produisent la toxine A et la toxine B. Ces dernières années, l'incidence et la sévérité des infections par *Clostridium difficile* ont augmenté dans le monde entier<sup>17</sup>.

La RT-PCR en temps réel permet une détection rapide, hautement sensible et spécifique de la cause infectieuse de la diarrhée. Un diagnostic précoce et fiable de l'agent pathogène responsable de la diarrhée permet l'administration d'un traitement spécifique aux patients hospitalisés et la prise de mesures d'hygiène pour prévenir la transmission nosocomiale.

### 3. Principe du test

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel est un test de diagnostic moléculaire pour la détection qualitative directe et la différenciation des norovirus (génogroupes 1 et II), des rotavirus et des gènes des toxines A (tcdA)/B (tcdB) de *Clostridium difficile* dans les échantillons de selles humaines.

La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape où la transcription inverse est suivie de la PCR dans le même tube de réaction. L'ARN isolé (norovirus, rotavirus) est transcrit en ADNc par une transcriptase inverse. Des fragments de gène spécifiques aux norovirus (région de jonction ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3) et de la toxine A/B (tcdA/tcdB) de *Clostridium difficile* sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel. Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la **Taq-Polymerase** rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel contient un **Internal Control RNA** (ICR)

en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

#### 4. Contenu du paquet

**Tableau 1** : Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

| Code du kit | Réactif              | Quantité |         | Couleur du couvercle |
|-------------|----------------------|----------|---------|----------------------|
| 1           | Reaction Mix         | 2x       | 1050 µl | jaune                |
| 2           | Enzyme Mix           | 1x       | 80 µl   | rouge                |
| R           | Internal Control RNA | 2x       | 1700 µl | brun                 |
| N           | No Template Control  | 1x       | 450 µl  | blanc                |
| P           | Positive Control     | 1x       | 200 µl  | bleu                 |

#### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

## 6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

**Tableau 2 : Matériel nécessaire**

| Plateformes d'extraction         |  |
|----------------------------------|--|
| R-Biopharm                       | RIDA <sup>®</sup> Xtract                                       |
| Promega                          | Maxwell <sup>®</sup> RSC                                       |
| Instruments de PCR en temps réel |  |
| Roche                            | LightCycler <sup>®</sup> 480II, LightCycler <sup>®</sup> 480 z |
| Agilent Technologies             | Mx3005P  |
| Applied Biosystems               | ABI 7500   |
| Bio-Rad                          | CFX96 <sup>™</sup>   |
| QIAGEN                           | Rotor-Gene Q   |

**Remarque : utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN)**

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup> GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler<sup>®</sup> 480II et LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables non poudrés
- Eau de PCR (sans nucléase)

## 7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test. Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses. Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.

- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.

Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

### 8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ARN/l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'acides nucléiques (par ex., RIDA<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell<sup>®</sup> RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire les acides nucléiques viraux conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer les échantillons de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/3. Agiter fortement l'échantillon de selles dilué et le centrifuger à 1 000 x g pendant 30 s. Utiliser le volume adéquat du surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel inclut un Internal Control RNA qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ARN de contrôle interne Internal Control RNA peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si l'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 1 µl au mélange maître (voir tableau 4).

Si l'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'en ajouter 20 µl pendant la procédure d'extraction. L'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl de l'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

## 9. Réalisation du test

### 9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus à chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3 et 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et le **Internal Control RNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

**Tableau 3** : Exemple de calcul et de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICR comme pour l'extraction et contrôle de l'inhibition de la PCR)

| Code du kit | Composants du mélange maître | Volume par réaction | 10 réactions (10 % de plus) |
|-------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 1           | <b>Reaction Mix</b>          | 19,3 µl             | 212,3 µl                    |
| 2           | <b>Enzyme Mix</b>            | 0,7 µl              | 7,7 µl                      |
|             | <b>Total</b>                 | <b>20 µl</b>        | <b>220 µl</b>               |

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

**Tableau 4** : Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICR uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

| Code du kit | Composants du mélange maître | Volume par réaction | 10 réactions (10 % de plus) |
|-------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| 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                       |
|             | <b>Total</b>                 | <b>21,0 µl</b>      | <b>231,0 µl</b>             |

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

**Contrôle négatif** : Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque** : si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

**Échantillon** : Ajouter 5 µl d'éluat au mélange maître pré-pipeté.

**Contrôle positif** : Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

**Remarque** : si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de RT-PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6).

## 9.3 Configuration de l'instrument de PCR

### 9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

**Tableau 5 :** Profil universel de RT-PCR en temps réel pour la série LightCycler®

|   |               |
|---|---------------|
| <u>Transcription inverse</u>                                | 10 min, 58 °C |
| Dénaturation initiale                                       | 1 min, 95 °C  |
| Cycles  | 45 cycles     |
| <u>PCR</u> Dénaturation                                     | 10 s, 95 °C   |
| Hybridation/extension                                       | 15 s, 60 °C   |
| Vitesse de transition/<br>Vitesse de montée de température/ | Maximale      |

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

**Tableau 6 :** Profil universel de RT-PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

|   |               |
|---|---------------|
| <u>Transcription inverse</u>                                | 10 min, 58 °C |
| Dénaturation initiale                                       | 1 min, 95 °C  |
| Cycles  | 45 cycles     |
| <u>PCR</u> Dénaturation                                     | 15 s, 95 °C   |
| Hybridation/extension                                       | 30 s, 60 °C   |
| Vitesse de transition/<br>Vitesse de montée de température/ | Maximale      |

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

**Remarque :** le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests de PCR en temps réel RIDA® GENE DNA et RIDA® GENE RNA sont combinés dans un même test.

## 9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 7 : Sélection des canaux de détection adéquats

| Instrument de PCR en temps réel | Détection                                  | Canal de détection | Remarque   |
|---------------------------------|--|--------------------|--|
| Roche LightCycler® 480II        | Norovirus                                  | 465/510            | Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire                      |
|                                 | ICR  | 533/580            |  |
|                                 | Rotavirus                                  | 533/610            |  |
|                                 | Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i> | 618/660            |  |
| Roche LightCycler® 480 z        | Norovirus                                  | 465/510            | Le kit RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire                      |
|                                 | ICR  | 540/580            |  |
|                                 | Rotavirus                                  | 540/610            |  |
|                                 | Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i> | 610/670            |  |
| Agilent Techn. Mx3005P          | Norovirus                                  | FAM                | Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé                                  |
|                                 | ICR  | HEX                |  |
|                                 | Rotavirus                                  | ROX                |  |
|                                 | Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i> | Cy5                |  |
| ABI 7500                        | Norovirus                                  | FAM                | Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée                    |
|                                 | ICR  | VIC                |  |
|                                 | Rotavirus                                  | ROX                |  |
|                                 | Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i> | Cy5                |  |
| Bio-Rad CFX96™                  | Norovirus                                  | FAM                | -  |
|                                 | ICR  | VIC                |  |
|                                 | Rotavirus                                  | ROX                |  |
|                                 | Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i> | Cy5                |  |
| Qiagen Rotor-Gene Q             | Norovirus                                  | Vert               | Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5, conformément aux paramètres par défaut |
|                                 | ICR  | Jaune              |  |
|                                 | Rotavirus                                  | Orange             |  |
|                                 | Toxine A/B de <i>Clostridium difficile</i> | Rouge              |  |

## 10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 8, figures 1, 2 et 3) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies de contrôle positif.

**Tableau 8** : Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites :

| Échantillon      | Résultat du test | Ct ICD             | Ct cible                            |
|------------------|------------------|--------------------|-------------------------------------|
| Contrôle positif | Positif          | S/O * <sup>1</sup> | Voir Certificat d'assurance qualité |
| Contrôle négatif | Négatif          | Ct > 20            | 0                                   |

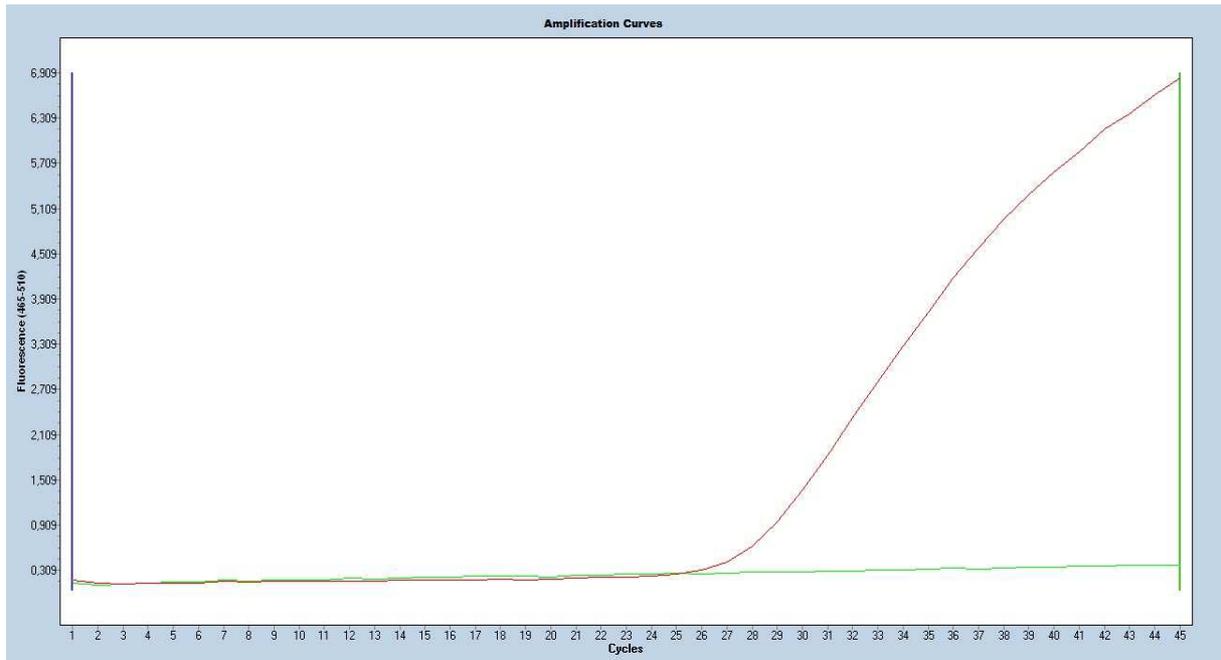
\*<sup>1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

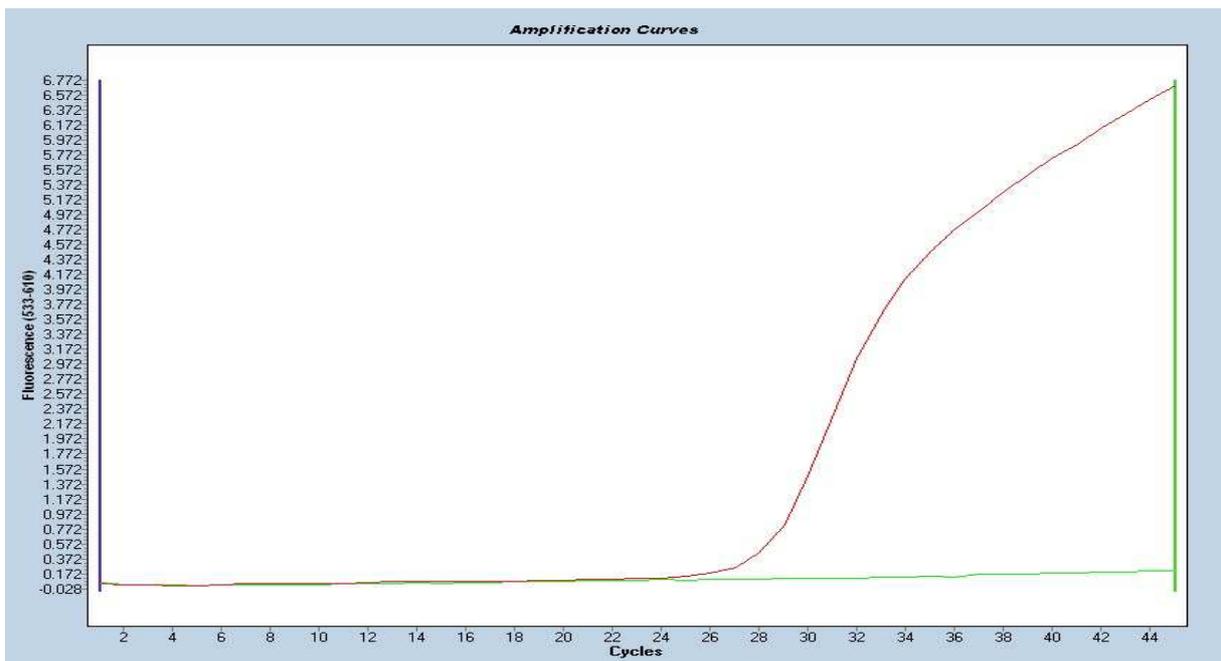
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

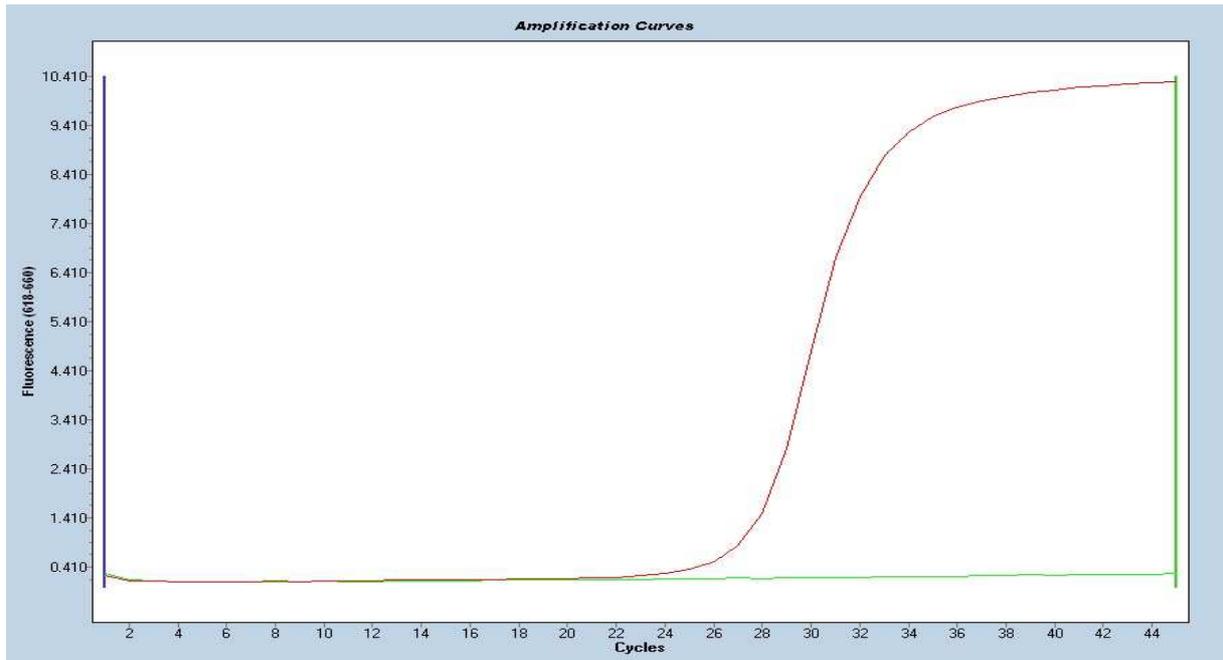
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



**Figure 1 :** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (norovirus) sur le LightCycler® 480II



**Figure 2 :** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (rotavirus) sur le LightCycler® 480II



**Figure 3 :** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (gènes des toxines A/B de *C. difficile*) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

**Tableau 9** : Interprétation des échantillons

| Détection |           |  | ICR/ICD         | Résultat   |
|-----------|-----------|--|-----------------|--|
| Norovirus | Rotavirus | Gènes des toxines A/B de <i>C. difficile</i> |                 |  |
| positif   | négatif   | négatif                                      | positif/négatif | Détection de norovirus   |
| négatif   | positif   | négatif                                      | positif/négatif | Détection de rotavirus   |
| négatif   | négatif   | positif                                      | positif/négatif | Toxine A/B de <i>C. difficile</i> détectée                         |
| positif   | positif   | négatif                                      | positif/négatif | Détection de Norovirus et de Rotavirus                             |
| négatif   | positif   | positif                                      | positif/négatif | Rotavirus et toxine A/B de <i>C. difficile</i> détectés            |
| positif   | négatif   | positif                                      | positif/négatif | Norovirus et toxine A/B de <i>C. difficile</i> détectés            |
| positif   | positif   | positif                                      | positif/négatif | Norovirus, rotavirus et toxine A/B de <i>C. difficile</i> détectés |
| négatif   | négatif   | négatif                                      | positif         | Gènes cibles non détectés  |
| négatif   | négatif   | négatif                                      | négatif         | Non valide   |

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

Un échantillon est également estimé positif si l'ARN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control RNA**. La détection du **Internal Control RNA** n'est pas nécessaire car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du **Internal Control RNA**.

Un échantillon est estimé négatif si l'ARN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour

le **Internal Control RNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA**.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit encore être dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

## 12. Limites de la méthode

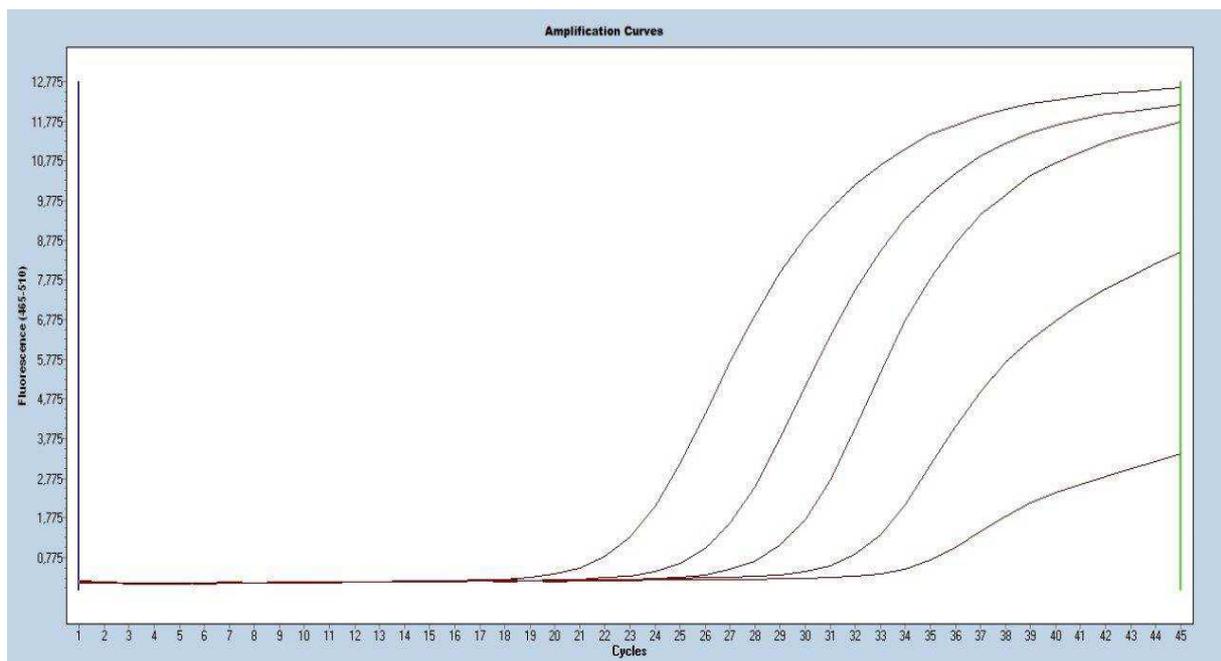
1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge virale inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux génotypes de norovirus et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (norovirus : région de jonction ORF1/ORF2, rotavirus : gène NSP3, toxine A/B : tcdA/tcdB *Clostridium difficile*) respectifs.
8. Le génogroupe IV de norovirus, qui infecte très rarement les humains, sera aussi détecté par le test RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel.
9. Les sérogroupes B et C de rotavirus ne sont pas détectés par le test RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel.

## 13. Performances

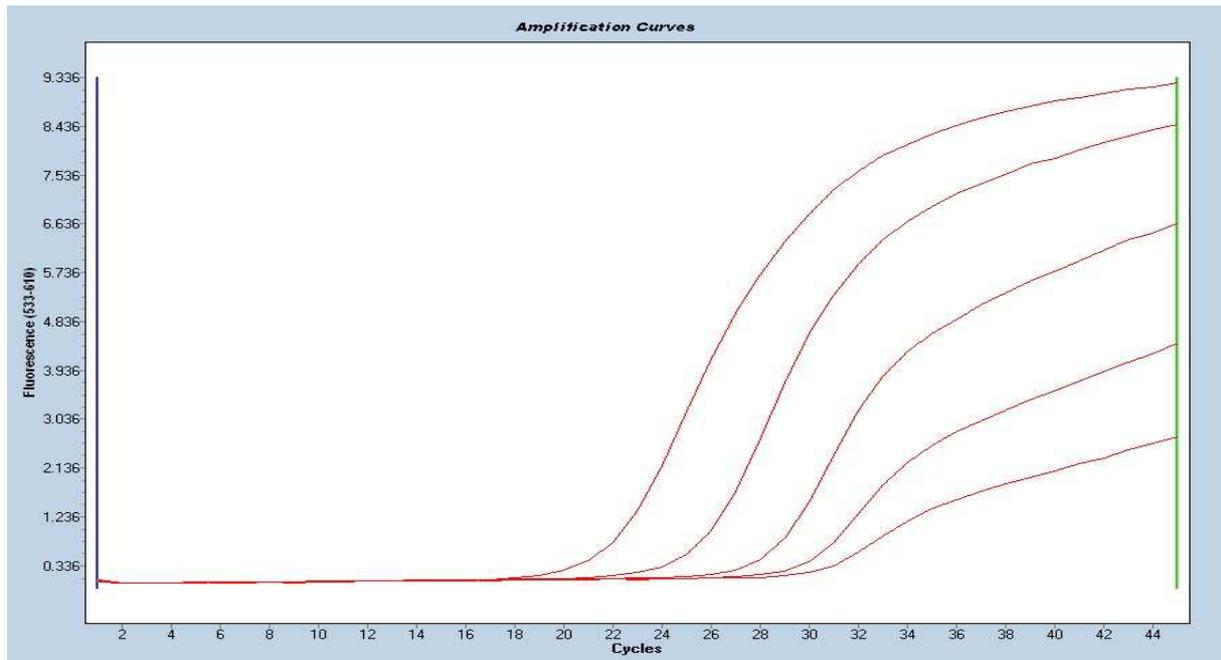
### 13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel est  $\geq 50$  copies par réaction pour le norovirus, le rotavirus et les gènes des toxines A/B de *Clostridium difficile*.

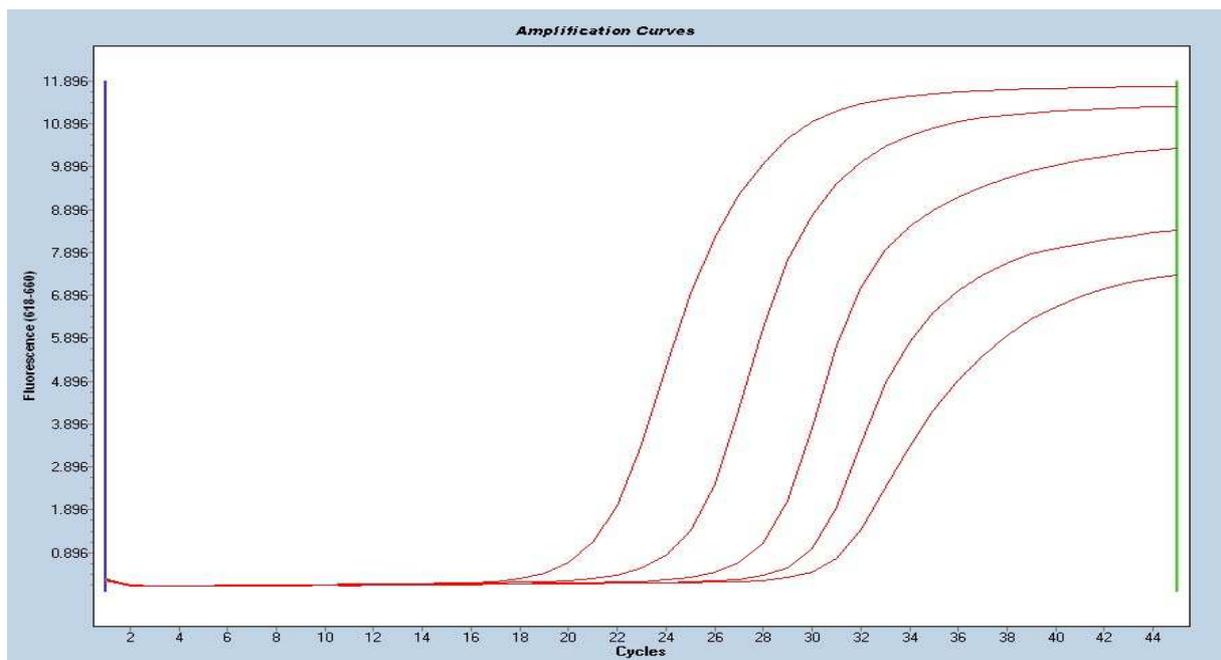
Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent les séries de dilution pour les norovirus et rotavirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$  chacune) et les gènes des toxines A/B de *Clostridium difficile* ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Figure 4** : Série de dilutions pour les norovirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Figure 5** : Série de dilutions pour les rotavirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II



**Figure 6** : Série de dilutions pour les gènes des toxines A/B de *Clostridium difficile* ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction des acides nucléiques et de la concentration en acides nucléiques.

## 13.2 Spécificité analytique

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel est spécifique pour les norovirus (génogroupes I, II et IV), les rotavirus (séro groupe A) et les gènes des toxines A/B de *Clostridium difficile*. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 10) :

**Tableau 10** : Test de la réactivité croisée

|  |   |  |   |   |   |                                   |   |
|--|---|--|---|---|---|-----------------------------------|---|
| Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71 | - | <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | - | <i>Cryptosporidium muris</i>            | - | <i>Klebsiella oxytoca</i>         | - |
| Adénovirus 7, humain, souche Gomen       | - | <i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>   | - | <i>Cryptosporidium parvum</i>           | - | <i>Proteus vulgaris</i>           | - |
| Adénovirus 40, humain, souche Dugan      | - | <i>Campylobacter upsaliensis</i>               | - | <i>E. coli</i> (O157:H7)                | - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     | - |
| Adénovirus 41, humain, souche 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 Clone C6 | - | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>    | - |
| <i>Campylobacter jejuni</i>              | - | <i>Clostridium sporogenes</i>                  | - | <i>Giardia lamblia</i>                  | - | <i>Yersinia enterocolitica</i>    | - |

### 13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Hospital Stool Panel a été évaluée par rapport à plusieurs génotypes des génogroupes I, II et IV de norovirus et plusieurs sérotypes de l'espèce A de rotavirus (voir tableau 11). Tous les génotypes de norovirus et les sérotypes de rotavirus du panel ont été détectés par le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Hospital Stool Panel.

**Tableau 11 :** Test de la réactivité analytique

| Norovirus                       |   |                                  |   |                   |   |
|---------------------------------|---|----------------------------------|---|-------------------|---|
| Génogroupe I                    |   |                                  |   |                   |   |
| GI.1 – Norwalk                  | + | GI.3 – Desert Shield, Birmingham | + | GI.6 – Hesse      | + |
| GI.2 – Southampton, Whiterose   | + | GI.4 – Chiba, Malta              | + | GI.7 – Winchester | + |
| GI.2 – Southampton, Southampton | + | GI.5 – Musgrove                  | + | GI.8 – Boxer      | + |
| Génogroupe 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 – Den Haag  | + |
| GII.4 – Bristol, Grimsby 2004   | + | GII.10 – Erfurt                  | + |                   |   |
| Génogroupe IV                   |   |                                  |   |                   |   |
| GIV.1 – Alpatron                | + |                                  |   |                   |   |
| Rotavirus                       |   |                                  |   |                   |   |
| Sérogroupe A                    |   |                                  |   |                   |   |
| Sérotipe G1                     | + | Sérotipe G2                      | + | Sérotipe G3       | + |
| Sérotipe G4                     | + | Sérotipe G9                      | + | Sérotipe G12      | + |

## 14. Historique des versions

| Numéro de version | Chapitre et désignation   |
|-------------------|---|
| 2018-09-20        | Révision générale<br>2. Résumé et explication du test<br>4. Contenu du paquet<br>5. Instructions de conservation des réactifs<br>6. Autres réactifs et matériel nécessaires<br>9. Réalisation du test<br>10. Contrôle qualité<br>12. Limites de la méthode<br>13. Performances<br>14. Historique des versions<br>15. Signification des symboles |

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
|  | Pour le diagnostic <i>in vitro</i> |
|  | Respecter le mode d'emploi         |
|  | Numéro de lot                      |
|  | Date de péremption                 |
|  | Température de stockage            |
|  | Numéro d'article                   |
|  | Nombre de tests                    |
|  | Date de fabrication                |
|  | Fabricant                          |

### Symboles spécifiques au test

Sans objet

## 16. Bibliographie

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