



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

**REF** PG0705



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



Deutsch .....	3
English.....	25
Español.....	47
Français.....	69
Italiano .....	91

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

**REF** PG0705

## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) / B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Die RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer im Krankenhaus erworbenen Gastroenteritis unterstützen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Nosokomiale Diarrhöen sind im Krankenhaus erworbene Durchfallerkrankungen, die definitionsgemäß nach 72 Stunden Krankenhausaufenthalt auftreten (3-Tage-Regel). Eine nosokomiale Diarrhö kann eine infektiöse oder nicht-infektiöse (z.B. durch Medikamente oder Chemotherapie) Ursache haben und betrifft bis zu ein Drittel der Krankenhauspatienten. Der bedeutendste und häufigste Erreger einer nosokomialen Diarrhö ist *Clostridium difficile*. Neben *Clostridium difficile* sind Noroviren und Rotaviren von besonderer Bedeutung. Nosokomiale Diarrhöen können schwerwiegende Komplikationen bei Patienten verursachen, verlängern den Krankenhausaufenthalt und erhöhen die Kosten.<sup>1,2,3,4</sup>

Noroviren verursachen mit Abstand die meisten Fälle aller nicht bakteriellen Gastroenteritis-Ausbrüche.<sup>5,6,7</sup> Eine durch Noroviren verursachte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Noroviren werden sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden. Eine aerogene Übertragung durch Bildung virushaltiger Aerosole ist häufig die Ursache einer sehr raschen Ausbreitung in Gemeinschaftseinrichtungen.<sup>8,9,10</sup> Das Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) schätzt, dass jedes Jahr in den USA durch Noroviren über 21 Millionen Fälle von akuter Gastroenteritis, 70.000 Krankenhausaufenthalte und 800 Todesfälle verursacht werden.<sup>11</sup> Noroviren gehören zur Familie der Caliciviridae und sind kleine, unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen RNA (ssRNA). Sie lassen sich in 7 Genogruppen mit derzeit über 30 verschiedenen Genotypen und einer Vielzahl von Stämmen unterteilen. Als humanpathogen sind bisher nur Vertreter aus der Genogruppe I

(GGI) mit 9 Genotypen und aus der Genogruppe II (GGII) mit 22 Genotypen, sowie Vertreter aus der Genogruppe IV beschrieben.<sup>18,19</sup>

Rotaviren gehören zur Familie der Reoviridae. Es handelt sich dabei um unbehüllte, ikosaedrische, doppelsträngige RNA (dsRNA) Viren. Man unterscheidet 7 Serogruppen (A - G). Humanpathogene Rotaviren sind in den Serogruppen A - C enthalten, wobei mehr als 90 % der Infektionen durch Rotaviren der Serogruppe A verursacht werden.<sup>12</sup> Die Symptome einer Rotavirus-Infektion sind meist Erbrechen, Durchfall und Abdominalschmerzen. Das Virus wird fäkal-oral, besonders durch Schmierinfektionen übertragen. Rotavirus ist bei Kindern unter fünf Jahren die Hauptursache einer Diarrhö und weltweit verantwortlich für den Tod von schätzungsweise 611.000 Kindern jährlich.<sup>13</sup>

Die Erstbeschreibung von *Clostridium difficile*, eines gram-positiven, sporenbildenden, anaeroben Bakteriums, erfolgte 1935 durch Hall und O'Toole, die die Darmflora gesunder Säuglinge untersuchten.<sup>14</sup> Erst in den späten 1970er wurde *Clostridium difficile* als Erreger der Antibiotika-assoziierten Diarrhö sowie der pseudomembranösen Kolitis identifiziert.<sup>15</sup> Heute ist *Clostridium difficile* einer der häufigsten Erreger der nosokomialen Diarrhö. *Clostridium difficile* ist die Hauptursache bei 15 – 25 % aller Patienten mit Antibiotika-assoziiierter Diarrhö und bei fast allen Patienten mit pseudomembranöser Kolitis.<sup>16</sup> Prädisponierende Risikofaktoren für eine *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhö sind z.B. Antibiotikatherapie, Alter des Patienten, sowie Länge und Anzahl der Krankenhausaufenthalte. Zunehmend erkranken aber auch nicht Antibiotika-therapierte und nicht hospitalisierte Patienten an einer *Clostridium difficile* Infektion. Die Krankheitssymptome reichen von leichten Durchfällen über Darmentzündungen unterschiedlicher Schwere bis hin zur pseudomembranösen Kolitis, der schwersten Form der Antibiotika-assoziierten Diarrhö. Die klinische Symptomatik wird durch toxigene Stämme von *Clostridium difficile*, die das Toxin A und Toxin B produzieren, hervorgerufen. In den letzten Jahren stiegen Anzahl und Schwere der Erkrankungen weltweit an.<sup>17</sup>

Die real-time RT-PCR erlaubt einen schnellen, hochsensitiven und spezifischen Nachweis für die Ursache einer infektiösen Diarrhö. Eine frühe und zuverlässige Diagnose des Diarrhö verursachenden Erregers ermöglicht eine schnelle spezifische Behandlung des Krankenhauspatienten und die Einleitung von Hygienemaßnahmen, um eine nosokomiale Übertragung zu verhindern.

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus (Genogruppe I und II), Rotavirus und der *Clostridium difficile* Toxin-Gene A (tcdA) / B (tcdB) in humanen Stuhlproben.

Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA (Norovirus, Rotavirus) wird dabei mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die spezifischen Genfragmente für Norovirus GGI und GGII (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3) und *Clostridium difficile* Toxin A / B (tcdA / tcdB) werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optischen Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test enthält eine **Internal Control RNA** (ICR) um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)**

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

### 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu **20 Mal** beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

**Tab. 2:** Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II, <b>LightCycler® 480 z</b>
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden**

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des **LightCycler® 480 z**
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- **PCR-Wasser (Nuklease-frei)**

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA/RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die DNA/RNA-Präparation aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches Nukleinsäure-Extraktionskit (z.B. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) oder Nukleinsäure-Extraktionssystem (z.B. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)) empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:3 mit Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 30 sec bei 1000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test enthält eine Internal Control RNA die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control RNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control RNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control RNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der

**Internal Control RNA** während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.3, Tab.4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme-Mix** die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme-Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme-Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

### 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.



**Negativkontrolle:** Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

**Proben:** Je 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die real-time RT-PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.5, Tab.6).

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

**Tab. 5:** Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im Schritt statt.

**Tab. 6:** Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Hinweis:** Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

## 9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	
	Rotavirus	Orange	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Red	

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 8:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA <sup>*1</sup>	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

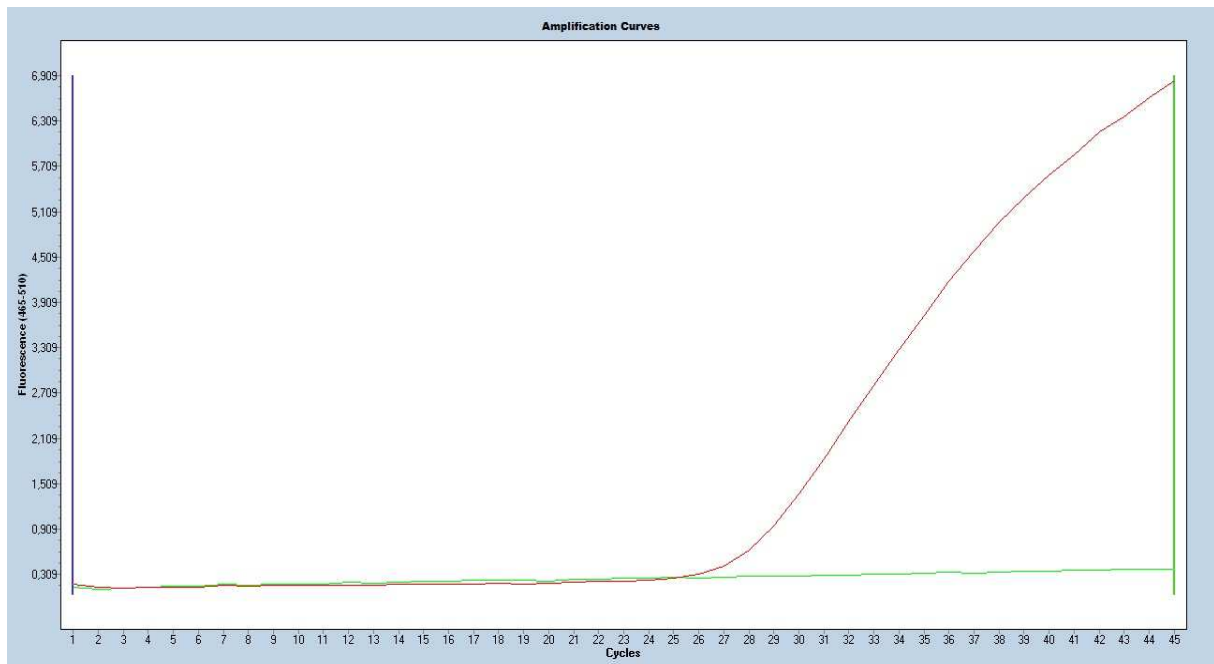
<sup>\*1</sup> Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle nicht in dem angegebenen Ct-Bereich liegt, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

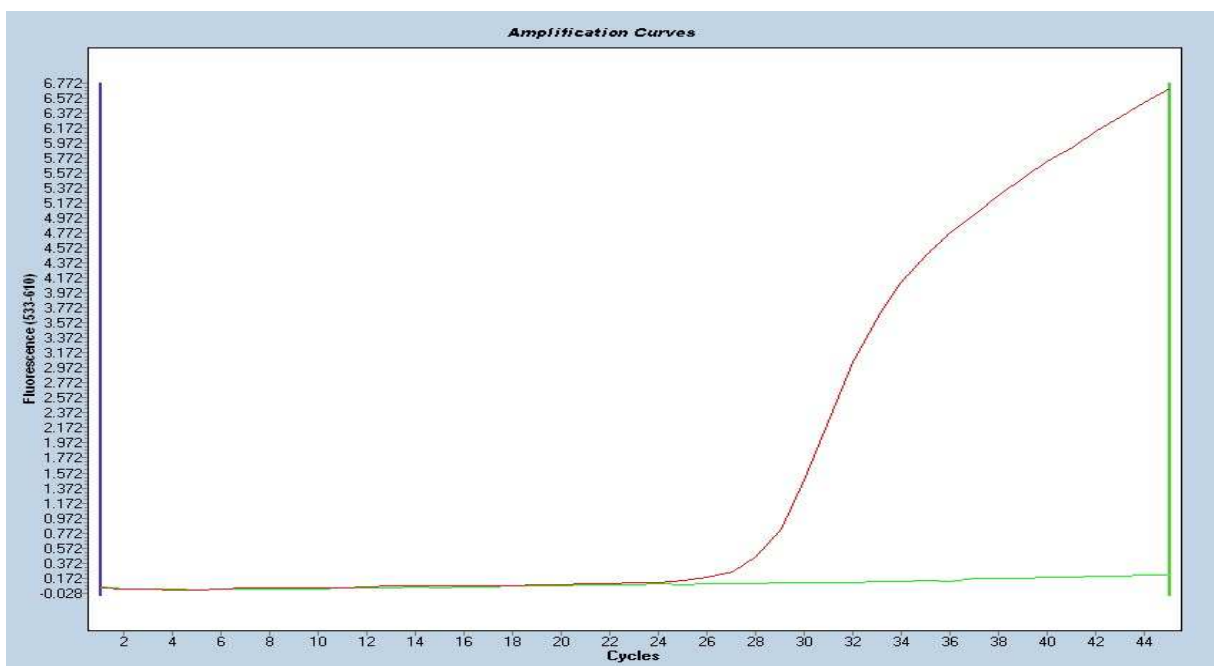
Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

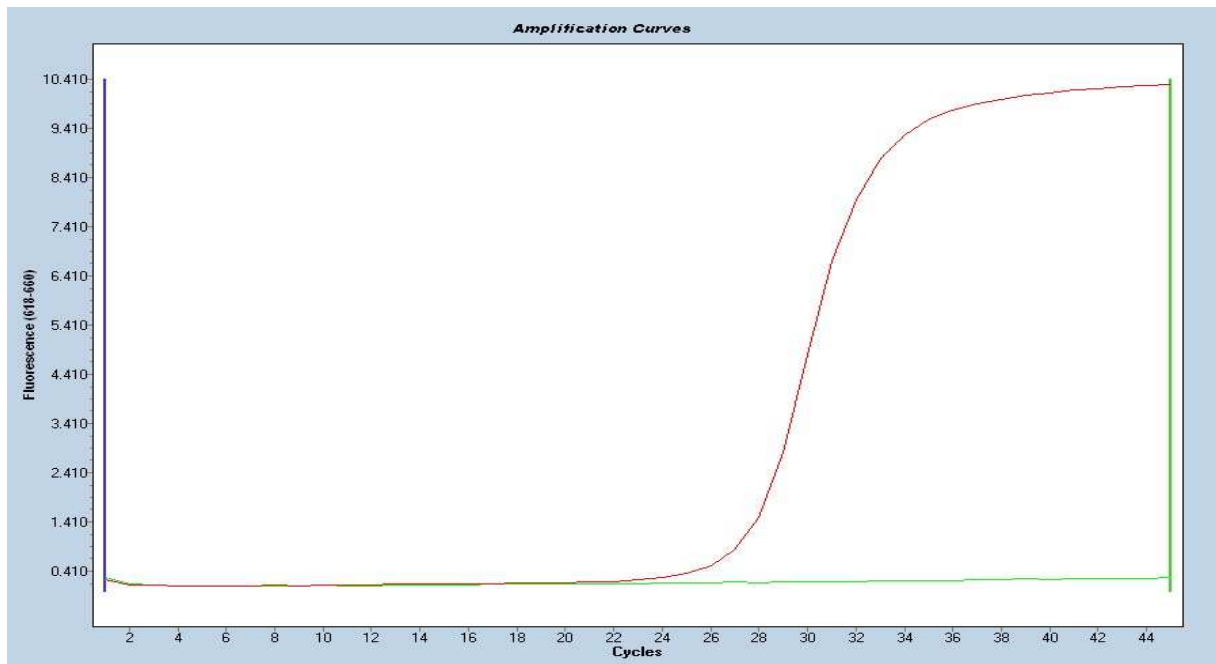
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Norovirus) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Rotavirus) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 3:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (*Clostridium difficile* Toxin-Gene A/B) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

**Tab. 9:** Interpretation der Ergebnisse

Nachweis				
Norovirus	Rotavirus	<i>C. difficile</i> Toxin-Gene A/B	ICR	Ergebnis
<b>positiv</b>	negativ	negativ	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Rotavirus nachweisbar</b>
negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b><i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus und Rotavirus nachweisbar</b>
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Rotavirus und <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus und <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/ negativ</b>	<b>Norovirus, Rotavirus und <i>C. difficile</i> Toxin A/B nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>Zielgene sind nicht nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	negativ	<b>Ungültig</b>

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA bzw. -RNA und die Internal Control RNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der Internal Control RNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die Internal Control RNA jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control RNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in der Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro*-diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene (Norovirus: ORF1/ORF2 junction Region, Rotavirus: NSP3, *Clostridium difficile* Toxin A/B: tcdA/tcdB) vorhanden sind.
8. Noroviren der Genogruppe IV, die in sehr seltenen Fällen auch Menschen infizieren können, werden ebenfalls mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test nachgewiesen.
9. Rotaviren der Serogruppe B und C werden nicht mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel Test nachgewiesen.

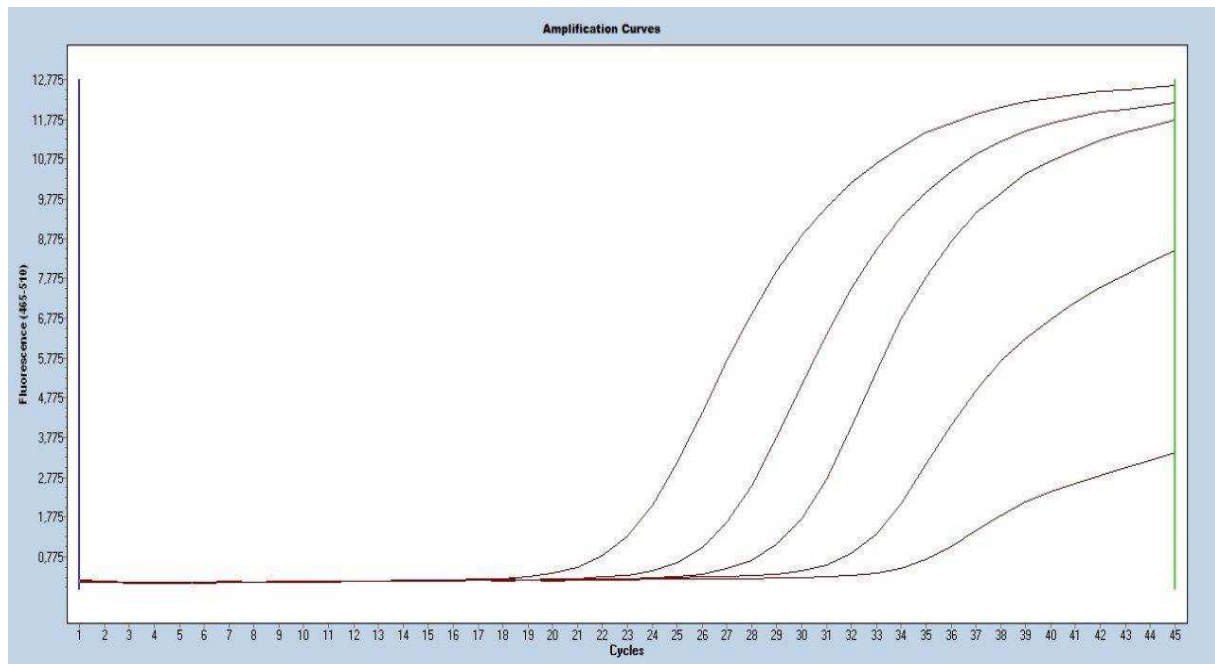


## 13. Leistungsmerkmale

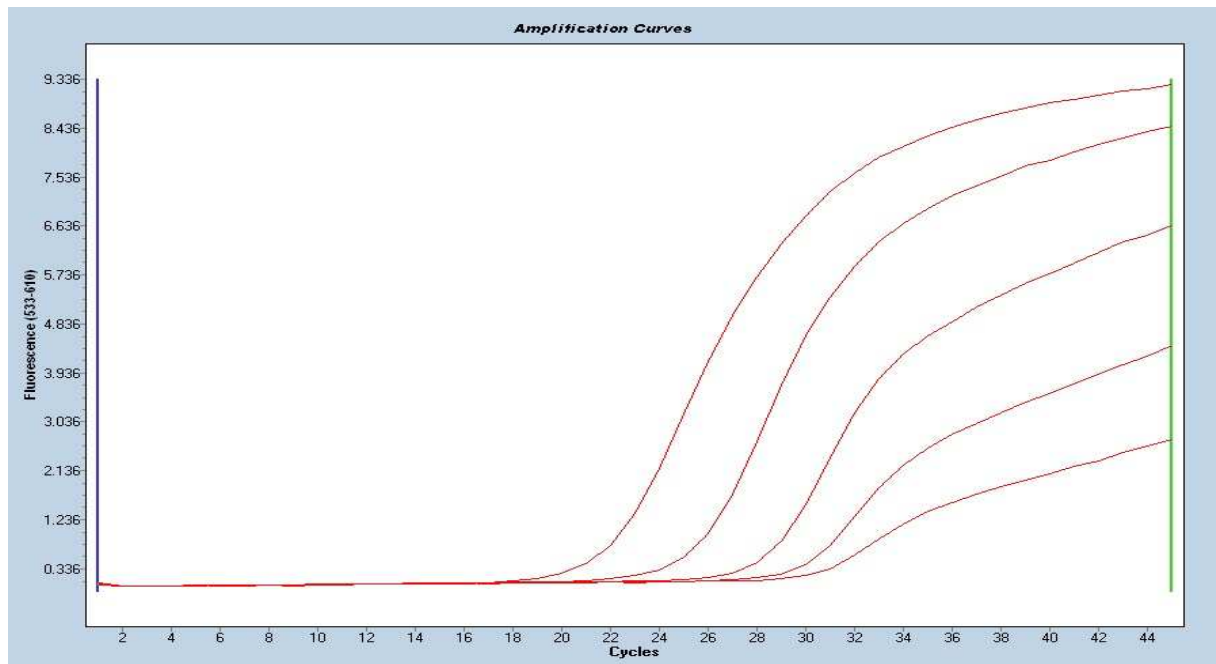
### 13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze  $\geq 50$  Kopien/Reaktion.

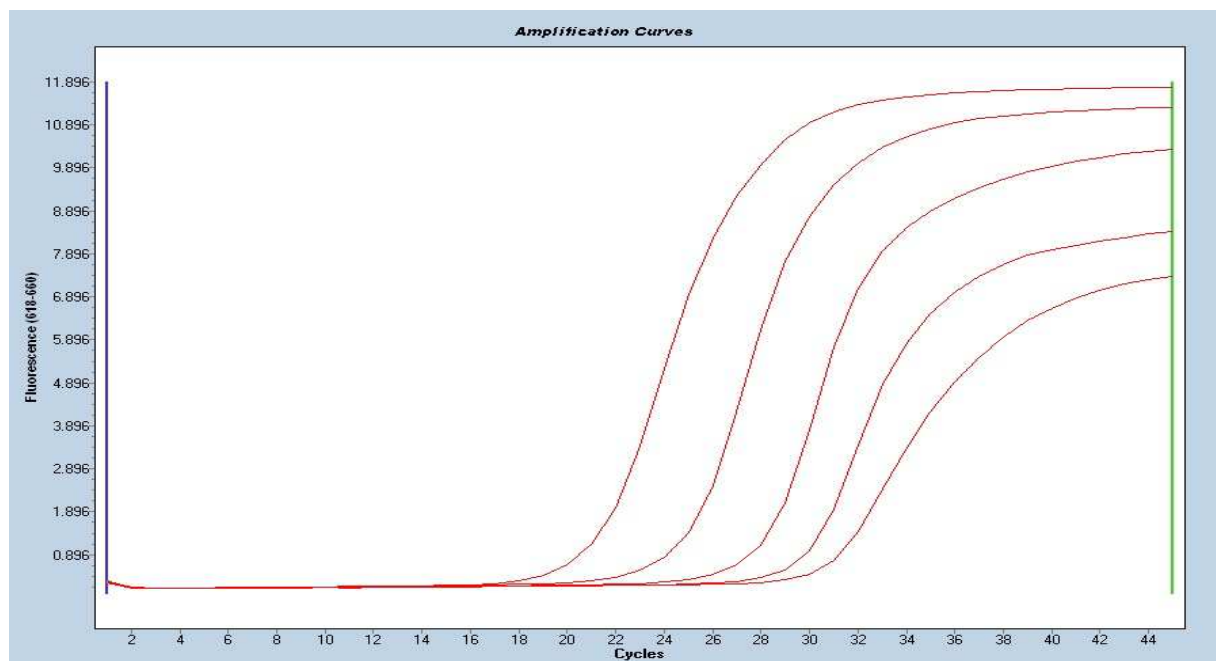
Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von Norovirus und Rotavirus ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) sowie der *Clostridium difficile* Toxin-Gen A/B ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Abb. 4:** Verdünnungsreihe Norovirus ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Abb. 5:** Verdünnungsreihe Rotavirus ( $10^5$  -  $10^1$  RNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe *C. difficile* Toxin-Gene A/B ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der Nukleinsäureextraktion und dem Nukleinsäuregehalt.

## 13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Norovirus (Genogruppe I, II und IV), Rotavirus (Serogruppe A) und *Clostridium difficile* Toxin-Gene A/B. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10):

**Tab. 10:** Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, human, strain 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 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Genotypen der Norovirus Genogruppe I, II und IV und verschiedenen Serotypen der Rotavirus Spezies A untersucht (s. Tab. 11). Alle Norovirus-Genotypen und Rotavirus-Serotypen des Probenpanels wurden mit der RIDA®GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR nachgewiesen.

**Tab. 11:** Analytische Reaktivitätstestung










Norovirus					
<b>Genogruppe I</b>					
GGI.1 – Norwalk	+	GGI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 – Hesse	+
GGI.2 – Southampton, Whiterose	+	GGI.4 – Chiba, Malta	+	GGI.7 – Winchester	+
GGI.2 – Southampton, Southampton	+	GGI.5 – Musgrove	+	GGI.8 – Boxer	+
<b>Genogruppe II</b>					
GGII.1 – Hawaii	+	GGII.4 – Sydney 2012	+	GGII.17 – Kawasaki	+
GGII.2 – Melksham	+	GGII.6 – Seacroft	+	GGII.b – Hilversum	+
GGII.3 – Toronto	+	GGII.7 – Leeds	+	GGII.c – Den Haag	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 – Erfurt	+		
<b>Genogruppe IV</b>					
GGIV.1 – Alphatron	+				
Rotavirus					
<b>Serogruppe A</b>					
Serotyp G1	+	Serotyp G2	+	Serotyp G3	+
Serotyp G4	+	Serotyp G9	+	Serotyp G12	+

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-09-20	Generelle Überarbeitung 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests 4. Packungsinhalt 5. Reagenzien und ihre Lagerung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 12. Grenzen der Methode 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	In-vitro-Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

## 16. Literatur

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





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

REF PG0705

## 1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel is a multiplex real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of norovirus (genogroup I and II), rotavirus and *Clostridium difficile* toxin genes A (tcdA) / B (tcdB) in human stool samples.

RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel real-time RT-PCR is intended for use as an aid in diagnosis of a hospital acquired gastroenteritis.

## 2. Summary and explanation of the test

Hospital acquired or nosocomial diarrhea is defined as an acute episode of diarrhea after 72 hours of hospitalization (3-day rule). The causes of hospital acquired diarrhea may be infectious or non-infectious (e.g. medication or chemotherapy) and affects up to one third of hospitalized patients. The most common infective cause of hospital acquired diarrhea is *Clostridium difficile*. Apart from *Clostridium difficile* other predominant infectious causes are norovirus and rotavirus. Hospital acquired diarrhea can cause serious complications in patients and increases length and costs of hospital stay.<sup>1,2,3,4</sup>

Noroviruses cause by far the most cases of non-bacterial gastroenteritis outbreaks.<sup>5,6,7</sup> A gastroenteritis caused by norovirus is manifested by severe nausea, vomiting and diarrhea. Noroviruses are egested by stool and with the vomit. An airborne transmission through aerosols containing the virus is often the cause of a very rapid spreading in shared facilities.<sup>8,9,10</sup> The Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) estimates that more than 21 million cases of acute gastroenteritis, 70.000 hospitalisations and 800 deaths are caused by norovirus infections each year in the United States.<sup>11</sup> Noroviruses belong to the family of Caliciviridae and are small, non-enveloped viruses with a single-stranded RNA (ssRNA). They can be grouped in 7 genogroups with currently over 30 genotypes and a multiplicity of clades. So far, human pathogens have only been described from genogroup I (GI) with 9 genotypes, from genogroup II (GII) with 22 genotypes and from genogroup IV.<sup>18,19</sup>

Rotaviruses belong to the Reoviridae family of non-enveloped, icosahedral, double-stranded RNA (dsRNA) viruses and are classified in 7 serogroups (A - G). Human infections are only caused by serogroup A, B and C, although rotavirus serogroup A accounts for more than 90 % of the infections.<sup>12</sup> Symptoms of rotavirus infection are usually vomiting, watery diarrhoea and abdominal pain. The virus is transmitted by

the faecal-oral route through contaminated hands and objects. Rotavirus is the main cause of diarrhoea in children aged under five and is responsible for the death of an estimated 611,000 children worldwide each year.<sup>13</sup>

*Clostridium difficile*, a gram-positive, spore-forming anaerobic bacterium was first described in 1935 by Hall and O'Toole as a component of the intestinal microflora in healthy neonates.<sup>14</sup> In the late 1970s, however, *Clostridium difficile* was identified as the cause of antibiotics-associated diarrhea and pseudomembranous colitis.<sup>15</sup> Today *Clostridium difficile* is one of the most common causes of nosocomial diarrhea.

*Clostridium difficile* is responsible for 15 - 25% of antibiotics-associated diarrhea and nearly all cases of pseudomembranous colitis.<sup>16</sup> The predisposing risk factors for CDAD are for example antibiotics exposure, advanced age as well as number and duration of hospitalization. However, *Clostridium difficile* infection is also seen in an increasing number of non-antibiotics-treated and non-hospitalized individuals. The symptoms range from mild diarrhea to intestinal infections of variable severity, including pseudomembranous colitis, the most severe form of antibiotics-induced inflammatory bowel disease. Clinically symptomatic cases are caused by toxigenic *Clostridium difficile* strains that produce toxin A and toxin B. In recent years the incidence and severity of *Clostridium difficile* infections increased worldwide.<sup>17</sup> Real-time RT-PCR permits a rapid, highly sensitive and specific detection of the infectious cause of diarrhea. An early and reliable diagnosis of the diarrhea causing pathogen makes it possible to administer specific treatment of hospitalized patients and also to initiate hygiene measures to prevent nosocomial transmission.

### 3. Test principle

The RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR is a molecular diagnostic test for the direct, qualitative detection and differentiation of norovirus (genogroup I and II), rotavirus and *Clostridium difficile* toxin genes A (tcdA) / B (tcdB) in human stool samples.

The detection is done in a one-step real-time RT-PCR format where the reverse transcription is followed by the PCR in the same reaction tube. The isolated RNA (norovirus, rotavirus) is transcribed into cDNA by a reverse transcriptase. Gene fragments specific for norovirus (ORF1/ORF2 junction region), rotavirus (NSP3) and *Clostridium difficile* toxin A/B (tcdA/tcdB) are subsequently amplified by real-time PCR. The amplified targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel assay contains an **Internal Control RNA** (ICR) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR-inhibition.

#### 4. Reagents provided

**Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)**

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	red
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brown
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

#### 5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

## 6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

**Tab. 2:** Necessary equipment

Extraction platforms	
R-Biopharm	RIDA <sup>®</sup> Xtract
Promega	Maxwell <sup>®</sup> RSC
Real-time PCR instruments	
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

**Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN)**

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler<sup>®</sup> 480II and the LightCycler<sup>®</sup> 480 z
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (nuclease-free)

## 7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Collection and storage of samples

### 8.1 Sample preparation from stool samples

For DNA/RNA isolation of human stool samples, use a commercially available nucleic acid extraction kit (e.g. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) or nucleic acid extraction system (e.g. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Extract viral nucleic acid according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool samples before extraction 1:3 with water. Vortex the diluted stool sample intensely and centrifuge at 1000 x g for 30 sec. Use from the supernatant the appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel assay contains an Internal Control RNA that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The Internal Control RNA can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the Internal Control RNA is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the Internal Control RNA should be added to the Master-Mix (see Tab.4).

If the Internal Control RNA is used as an extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the Internal Control RNA has to be added during extraction procedure. The Internal Control RNA should always be added to the specimen-lysis buffer mixture

and must **not** be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

## 9. Test procedure

### 9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab.3, Tab.4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Enzyme-Mix**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control RNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master Mix (ICR as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
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>

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

**Tab. 4:** Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master Mix (ICR only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µl	212.3 µl
2	<b>Enzyme-Mix</b>	0.7 µl	7.7 µl
R	<b>Internal Control RNA</b>	1.0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

## 9.2 Preparation of the PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

**Negative control:** Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master Mix.

**Note:** If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR-Mix of the negative control.

**Sample:** Add 5 µl eluate to the pre-pipetted Master Mix.

**Positive control:** Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master Mix.

**Note:** If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The RT-PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6).

### 9.3 PCR instrument set-up

#### 9.3.1 Universal real-time RT-PCR profile

**Tab. 5:** Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Note: Annealing and Extension occur in the same step**

**Tab. 6:** Universal real-time RT-PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Note: Annealing and Extension occur in the same step**

**Note: The universal real-time PCR profile can also be used for DNA assays if RIDA® GENE DNA and RIDA® GENE RNA real-time PCR assays are combined in one run.**



## 9.4 Detection channel set-up

Tab. 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection channel	Note
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Check that the reference dye is none
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	The gain settings have to be set to 5, according to the default settings
	ICR	Yellow	
	Rotavirus	Orange	
	<i>C. difficile</i> Toxin A/B	Red	

## 10. Quality control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Negative control and positive control have to show correct results (see Table 8, Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of  $10^3$  copies/ $\mu$ l. In each PCR run it is used in a total amount of  $5 \times 10^3$  copies.

**Tab. 8:** For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA <sup>*1</sup>	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

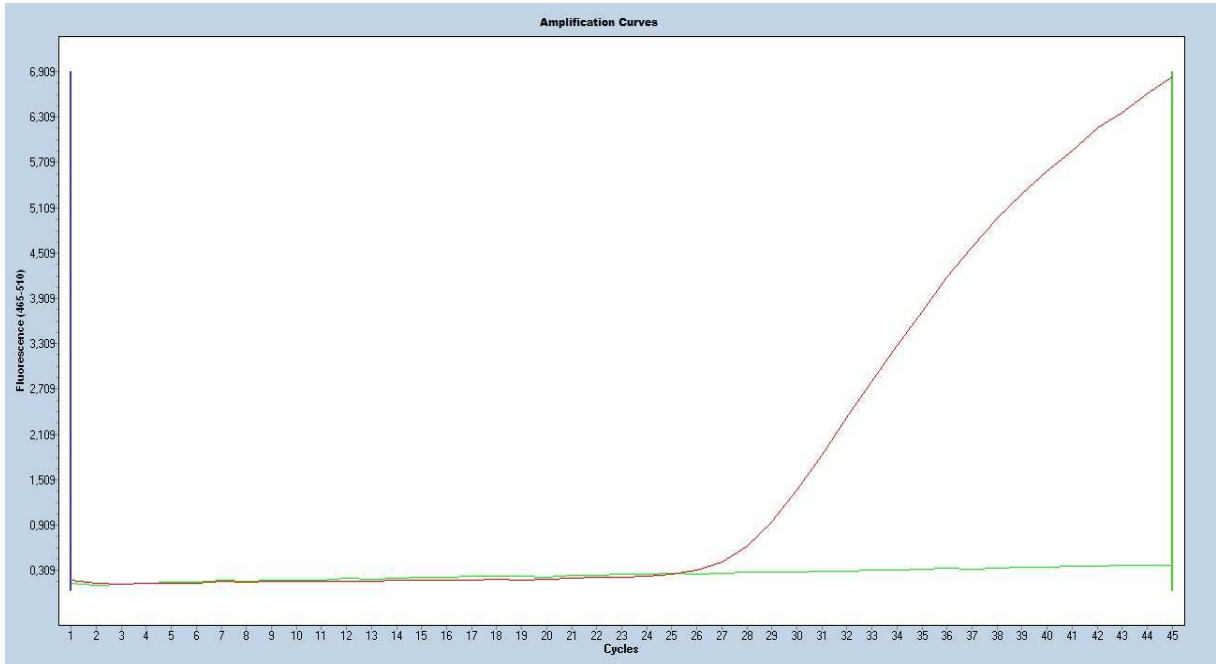
<sup>\*1</sup> No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the Positive Control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

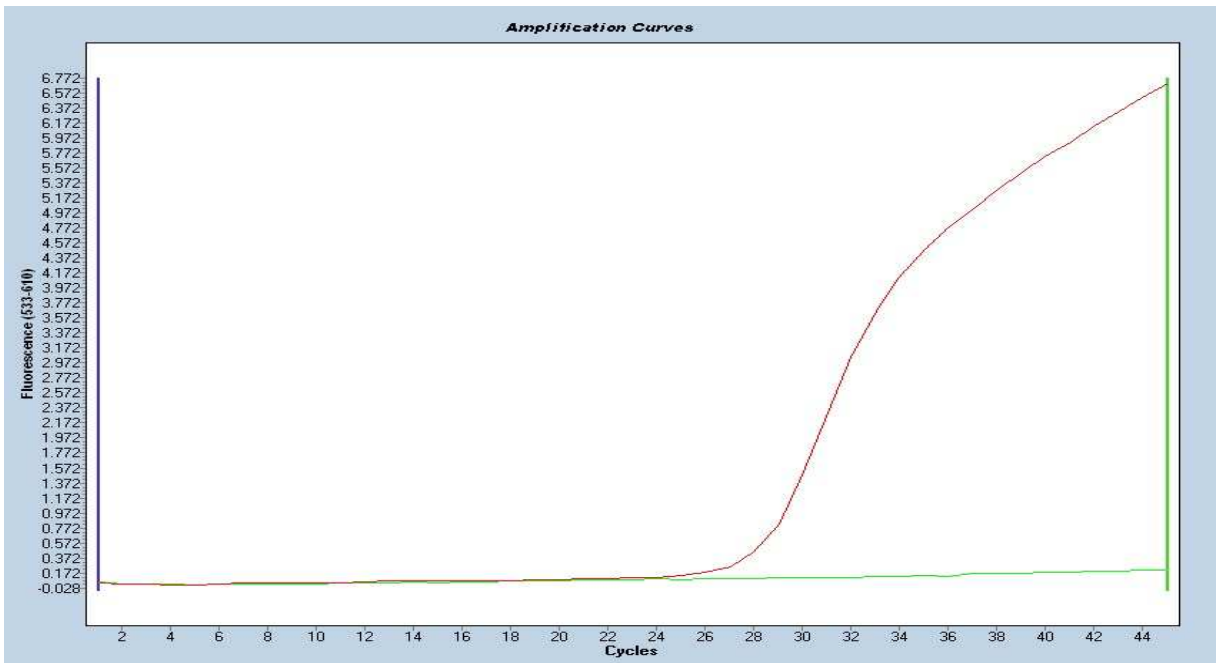
If the negative control is not negative but the positive control is valid prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

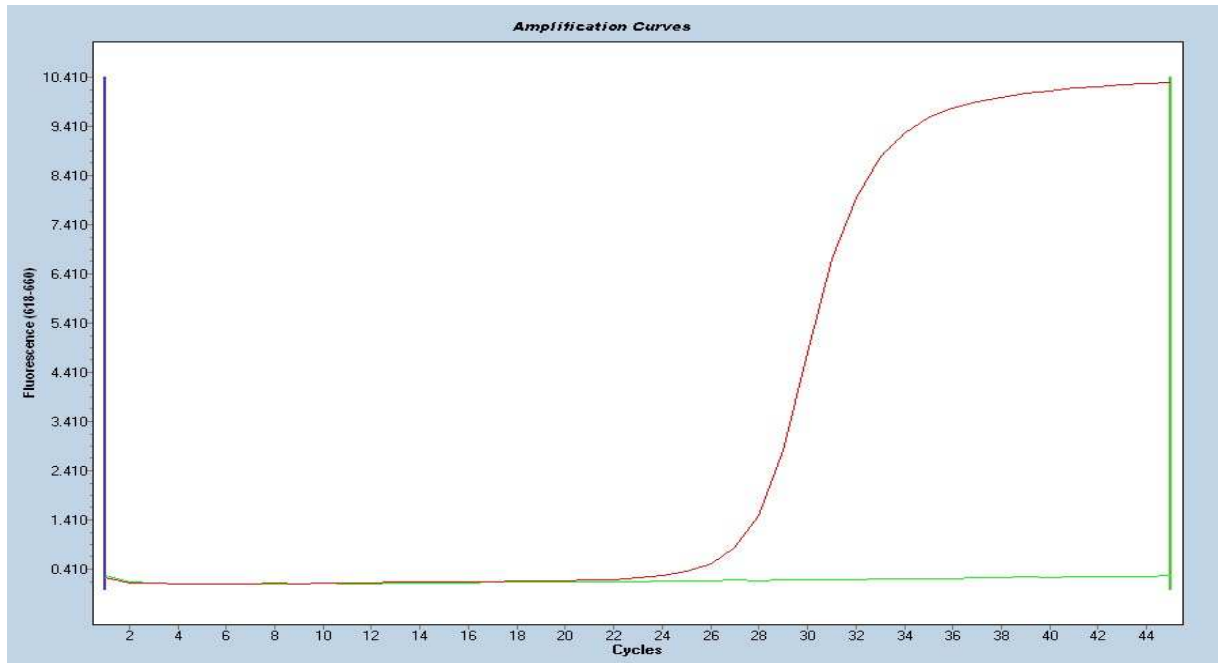
- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure



**Fig. 1:** Correct run of the positive and negative control (norovirus) on the LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Correct run of the positive and negative control (rotavirus) on the LightCycler® 480II



**Fig. 3:** Correct run of the positive and negative control (*C. difficile* toxin genes A/B) on the LightCycler® 480II

## 11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 9.

**Tab. 9:** Sample interpretation

Detection				
Norovirus	Rotavirus	<i>C.difficile</i> toxin gene A/B	ICR/ICD	Result
<b>positive</b>	negative	negative	<b>positive/negative</b>	<b>Norovirus detected</b>
negative	<b>positive</b>	negative	<b>positive/negative</b>	<b>Rotavirus detected</b>
negative	negative	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b><i>C. difficile</i> toxin A/B detected</b>
<b>positive</b>	<b>positive</b>	negative	<b>positive/negative</b>	<b>Norovirus and Rotavirus detected</b>
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b>Rotavirus and <i>C. difficile</i> Toxin A/B detected</b>
<b>positive</b>	negative	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b>Norovirus and <i>C. difficile</i> Toxin A/B detected</b>
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	<b>Norovirus, Rotavirus and <i>C. difficile</i> Toxin A/B detected</b>
negative	negative	negative	<b>positive</b>	<b>Target genes not detected</b>
negative	negative	negative	negative	<b>Invalid</b>

A sample is evaluated positive, if the sample RNA and the Internal Control RNA show an amplification signal in the detection system.

A sample is also evaluated positive, if the sample RNA shows an amplification signal but none for the Internal Control RNA in the detection system. The detection of the Internal Control RNA is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control RNA.

A sample is evaluated negative, if the sample RNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control RNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control RNA.

A sample is evaluated invalid, if the sample RNA and Internal Control RNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor. The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

## 12. Limitations of the method

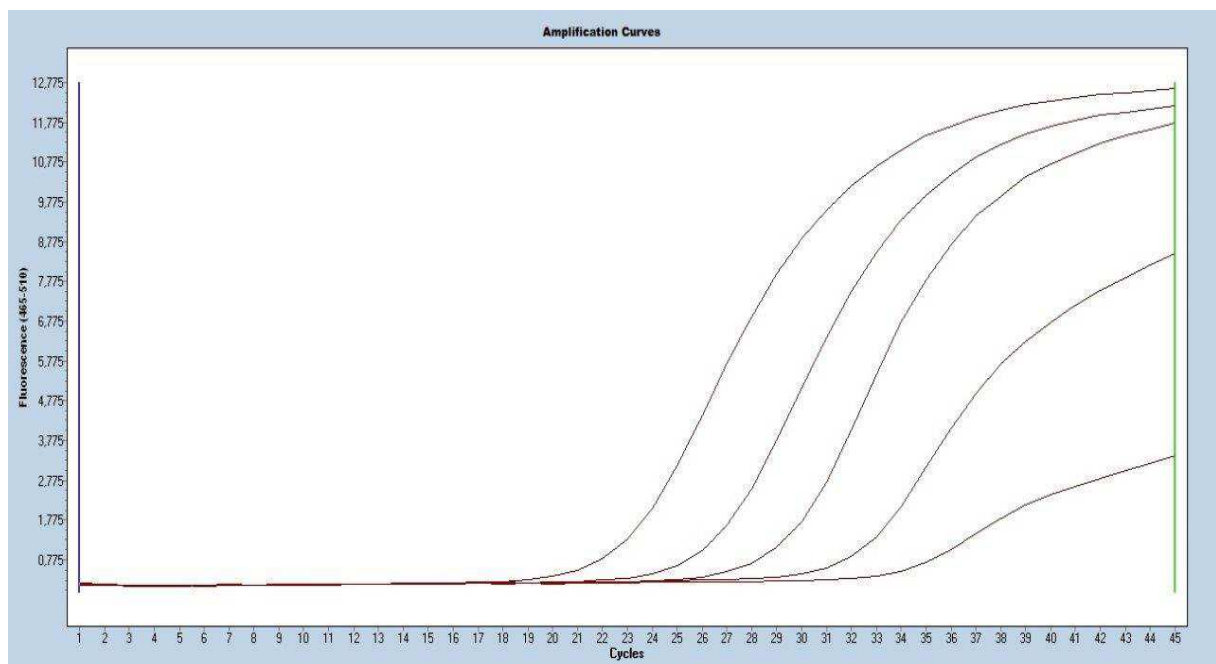
1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This test is only validated for stool samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a viral load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new norovirus genotypes resulting in a false negative result with the RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel assay.
6. As with all PCR based in vitro diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the respective target genes (Norovirus: ORF1/ORF2 junction region, Rotavirus: NSP3 gene, *Clostridium difficile* toxin A/B: tcdA/tcdB).
8. Norovirus genogroup IV, which very rarely infect humans, will be also detected by the RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel assay.
9. Rotavirus serogroup B and C will not be detected by the RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel assay.

### 13. Performance characteristics

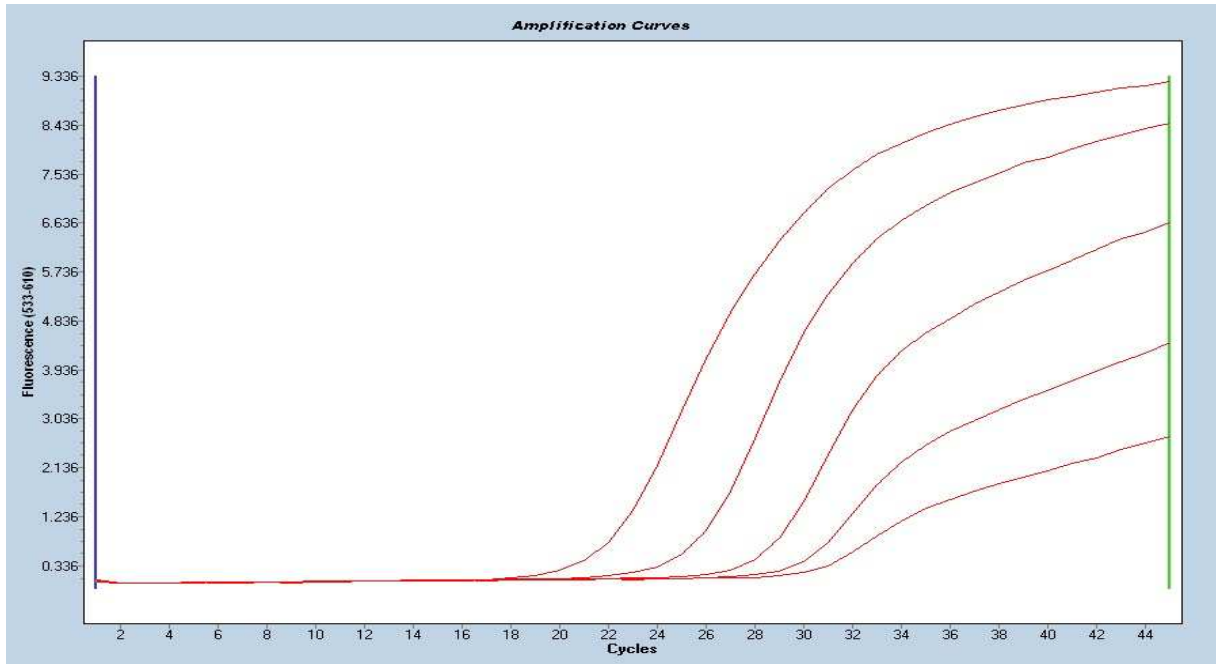
#### 13.1 Analytical sensitivity

The RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR has a detection limit of  $\geq 50$  copies per reaction for norovirus, rotavirus and *Clostridium difficile* toxin genes A/B.

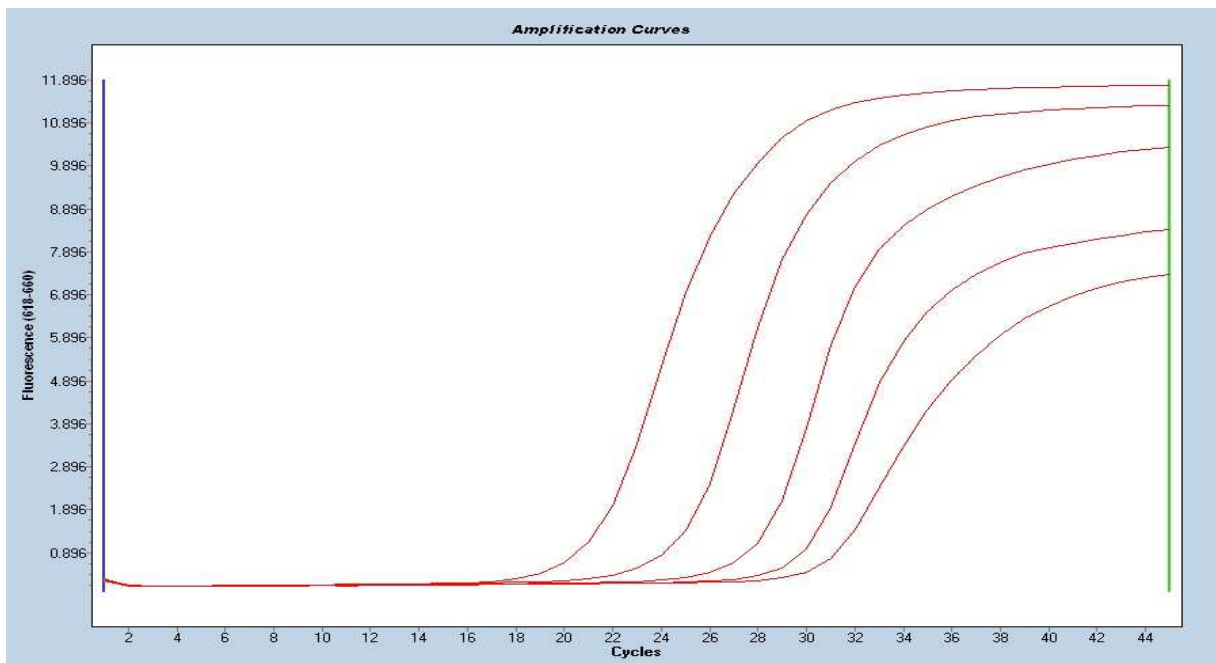
The following figures 4, 5 and 6 show dilution series of norovirus, rotavirus (each  $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu\text{l}$ ) and *Clostridium difficile* toxin genes A/B ( $10^5 - 10^1$  DNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Fig. 4:** Dilution series norovirus ( $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 5:** Dilution series rotavirus ( $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Fig. 6:** Dilution series *Clostridium difficile* toxin genes A/B ( $10^5 - 10^1$  RNA copies per  $\mu\text{l}$ ) on the LightCycler<sup>®</sup> 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, nucleic acid extraction and nucleic acid concentration.



## 13.2 Analytical specificity

The RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR is specific for norovirus (genogroups I, II and IV), rotavirus (serogroup A) and *Clostridium difficile* toxin genes A/B. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 10):

**Tab. 10:** Cross-reactivity testing

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, human, strain 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 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR was evaluated against multiple genotypes of the norovirus genogroup I, II and IV and different serotypes of the rotavirus species A (see Tab. 11). All Norovirus genotypes and Rotavirus serotypes of the panel were detected by the RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel multiplex real-time RT-PCR.

**Tab. 11:** Analytical reactivity testing










Norovirus					
Genogroup 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	+
Genogroup 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	+		
Genogroup IV					
GIV.1 – Alpatron	+				
Rotavirus					
Serogroup A					
Serotype G1	+	Serotype G2	+	Serotype G3	+
Serotype G4	+	Serotype G9	+	Serotype G12	+

## 14. Version history

Version number	Chapter and designation
2018-09-20	General revision 2. Summary and explanation of the test 4. Reagents provided 5. Storage instructions 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 9. Test procedure 10. Quality control 12. Limitations of the method 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

## 15. Explanation of symbols

### General symbols

	For in vitro diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

### Testspecific symbols

Not applicable

## 16. Literature

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



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

**REF** PG0705

## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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.<sup>1,2,3,4</sup>

Los norovirus son, con diferencia, la causa de la mayoría de los brotes de gastroenteritis no bacteriana.<sup>5,6,7</sup> 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.<sup>8,9,10</sup> 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.<sup>11</sup>

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).<sup>18,19</sup>

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

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.<sup>12</sup> 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.<sup>13</sup>

*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.<sup>14</sup> 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.<sup>15</sup> 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.<sup>16</sup> 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.<sup>17</sup>

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<sup>®</sup>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](mailto: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](http://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<sup>®</sup> Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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	<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>

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	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme-Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

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 <i>C. 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 <i>C. 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 <i>C. 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 <i>C. difficile</i>	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Toxina A/B de <i>C. 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 <i>C. 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/ $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de  $5 \times 10^3$  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 * <sup>1</sup>	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

\*<sup>1</sup> No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.

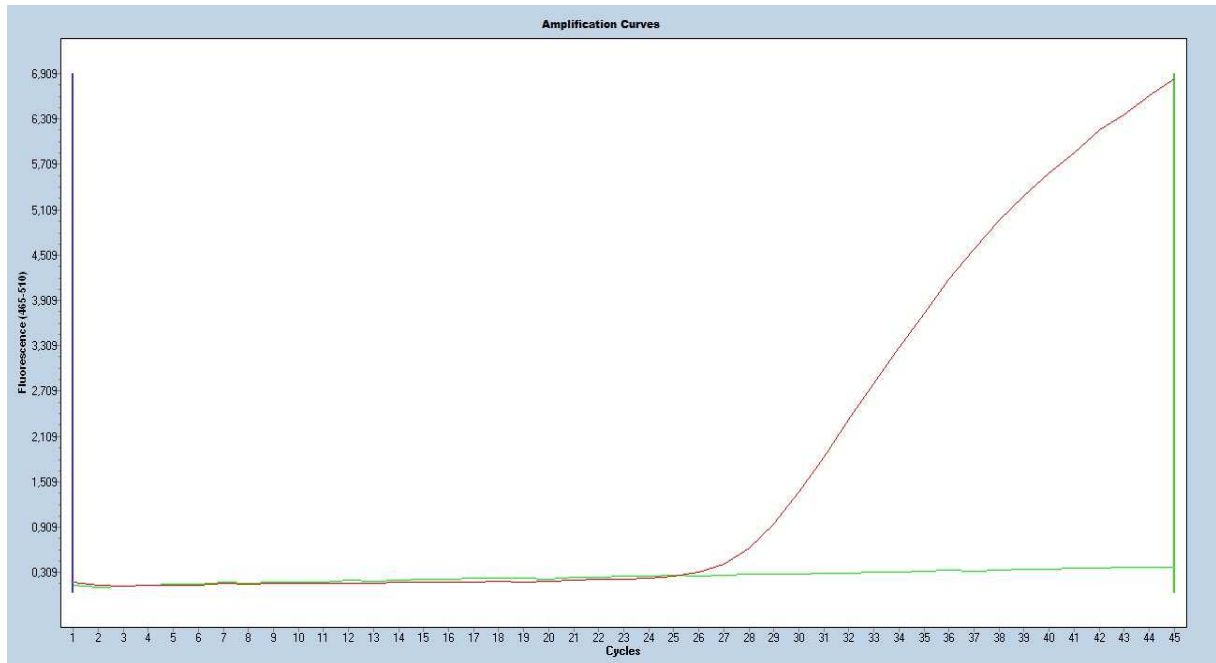
Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

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

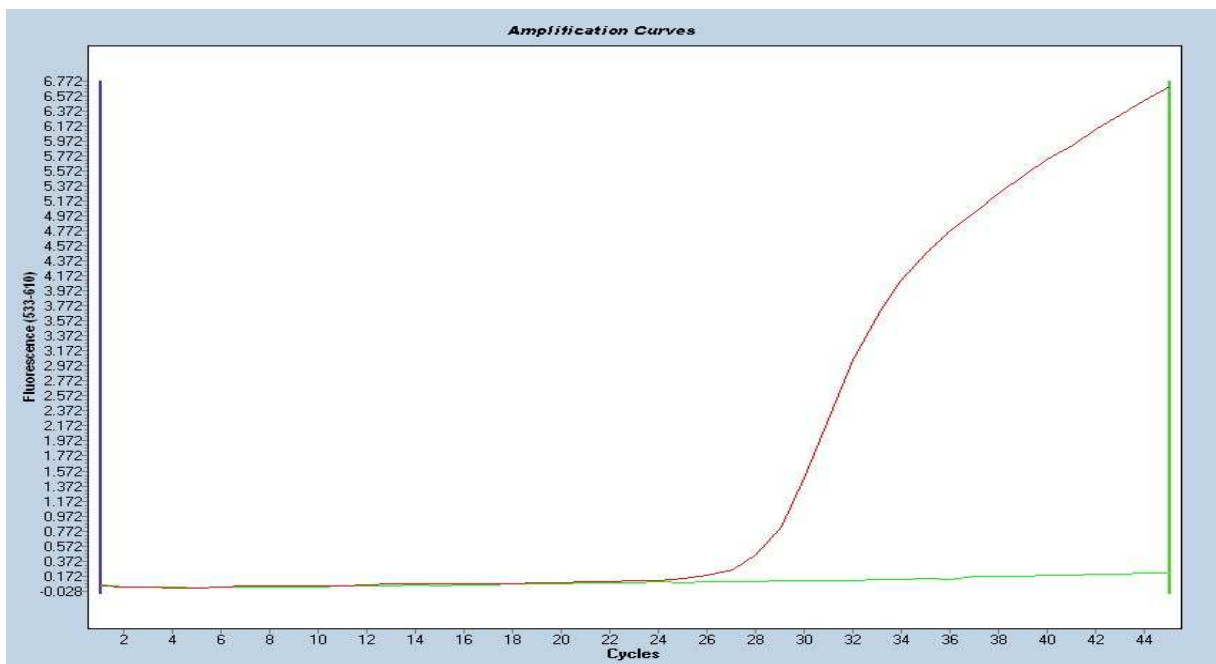
Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

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

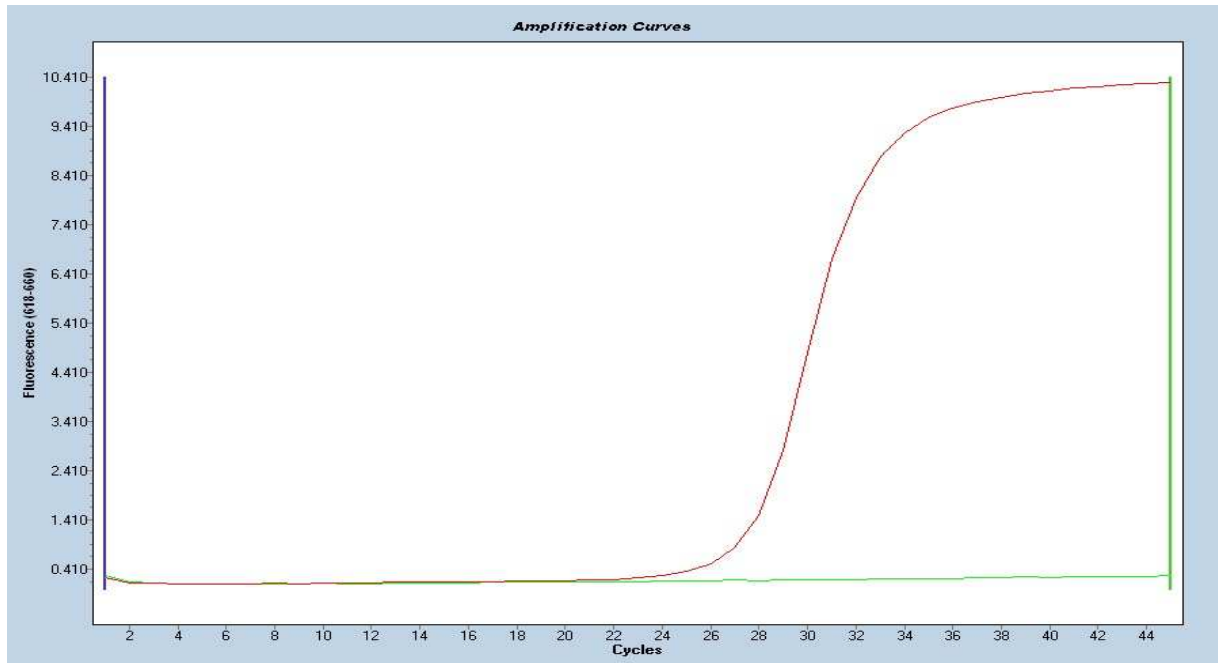




**Figura 1:** Procesamiento correcto de los controles positivo y negativo (norovirus) en el LightCycler® 480II



**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
<b>positivo</b>	negativo	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus detectado</b>
negativo	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Rotavirus detectado</b>
negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectadas</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus y rotavirus detectados</b>
negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Rotavirus y toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados</b>
<b>positivo</b>	negativo	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus y toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados</b>
<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo</b>	<b>positivo/negativo</b>	<b>Norovirus, rotavirus y toxinas A/B de <i>C. difficile</i> detectados</b>
negativo	negativo	negativo	<b>positivo</b>	<b>Genes diana no detectados</b>
negativo	negativo	negativo	negativo	<b>No válido</b>

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

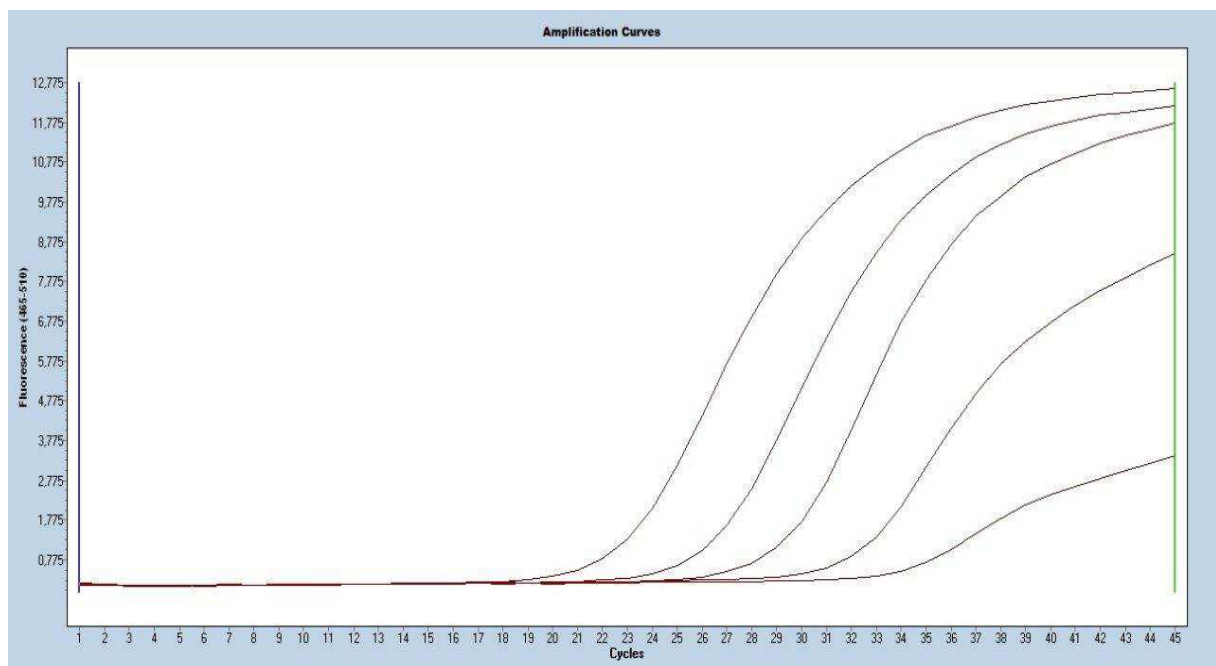
1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel.
9. El ensayo RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel no detecta a los rotavirus de los serogrupos B y C.

## 13. Características de rendimiento

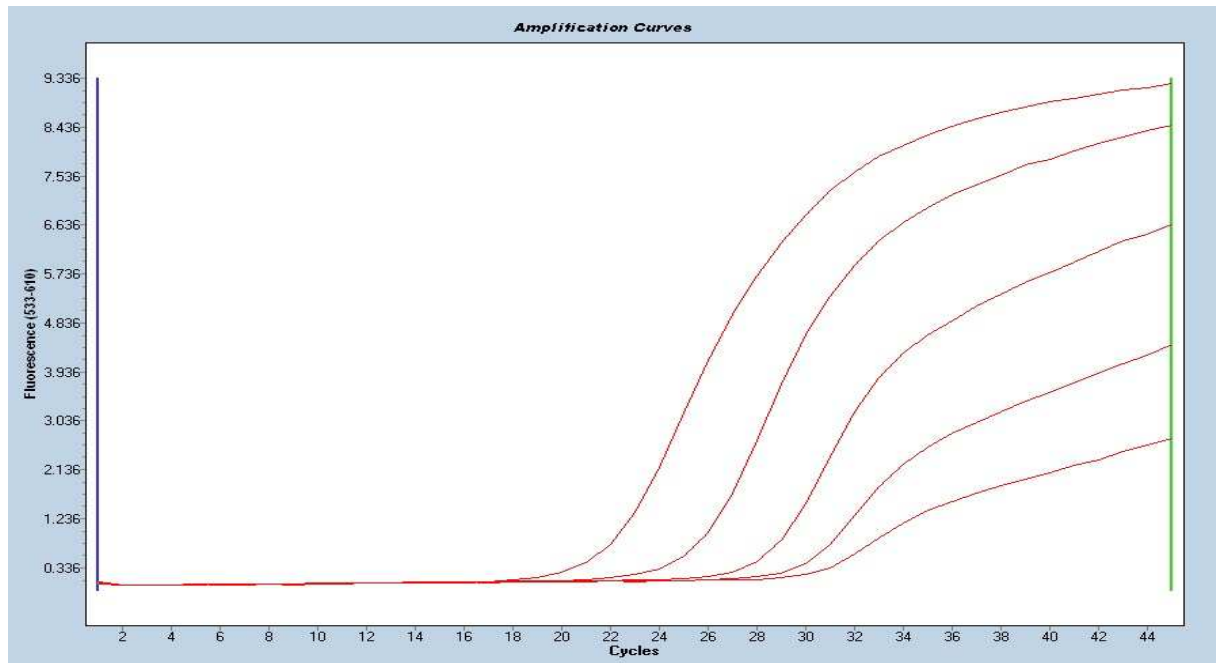
### 13.1 Sensibilidad analítica

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

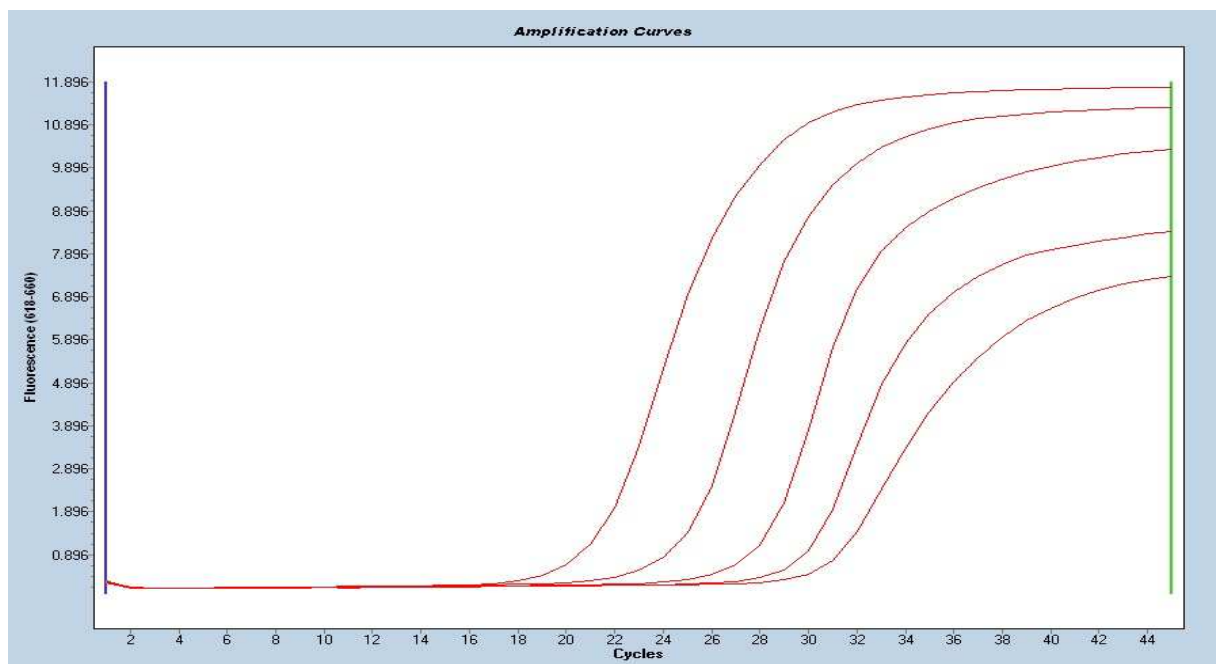
Las figuras 4, 5 y 6, a continuación, muestran diluciones seriadas de norovirus, rotavirus ( $10^5$  -  $10^1$  copias de ARN por  $\mu\text{l}$  en cada caso) y genes de las toxinas A/B de *Clostridium difficile* ( $10^5$  -  $10^1$  copias de ADN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II.



**Figura 4:** Dilución seriada de norovirus ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ARN por  $\mu\text{l}$ ) en el LightCycler® 480II



**Figura 5:** Dilución seriada de rotavirus ( $10^5$  a  $10^1$  copias de ARN por  $\mu\text{l}$ ) 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  $\mu\text{l}$ ) 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					
<b>Genogrupo I</b>					
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	+
<b>Genogrupo II</b>					
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	+		
<b>Genogrupo IV</b>					
GIV.1 – Alpatron	+				
Rotavirus					
<b>Serogrupo A</b>					
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



# RIDA® GENE Hospital Stool Panel

REF PG0705

## 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 augmente 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®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® 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® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
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® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler® 480II et LightCycler® 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/ 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/ 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

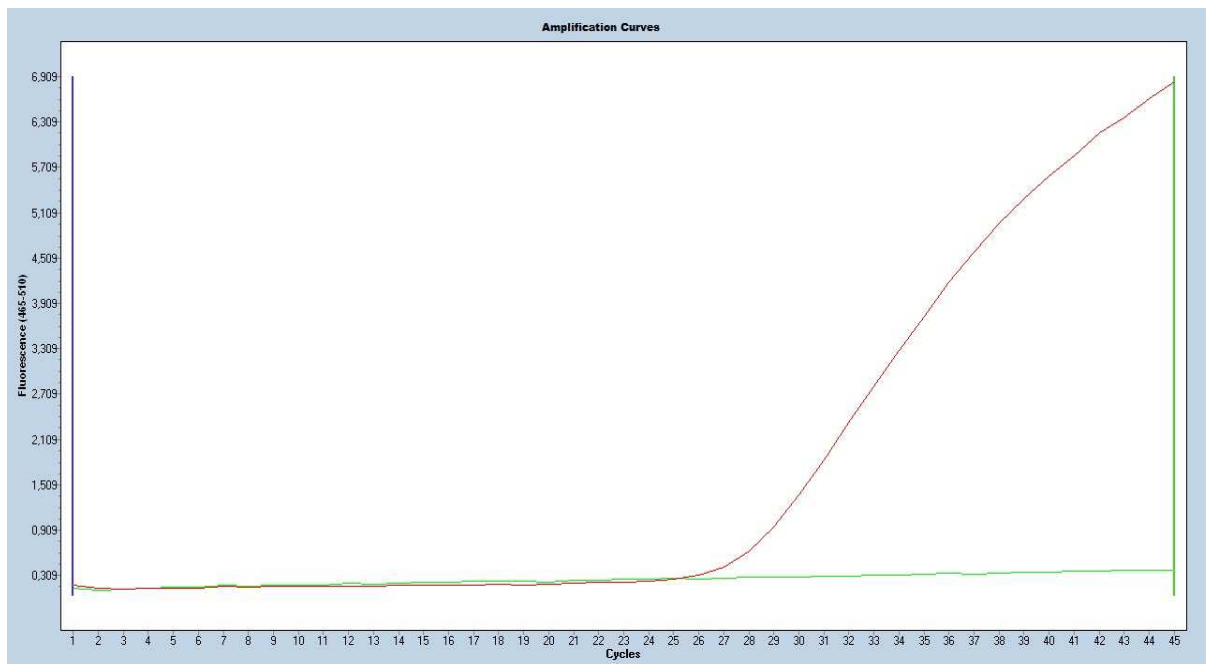
\*<sup>1</sup> Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

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.

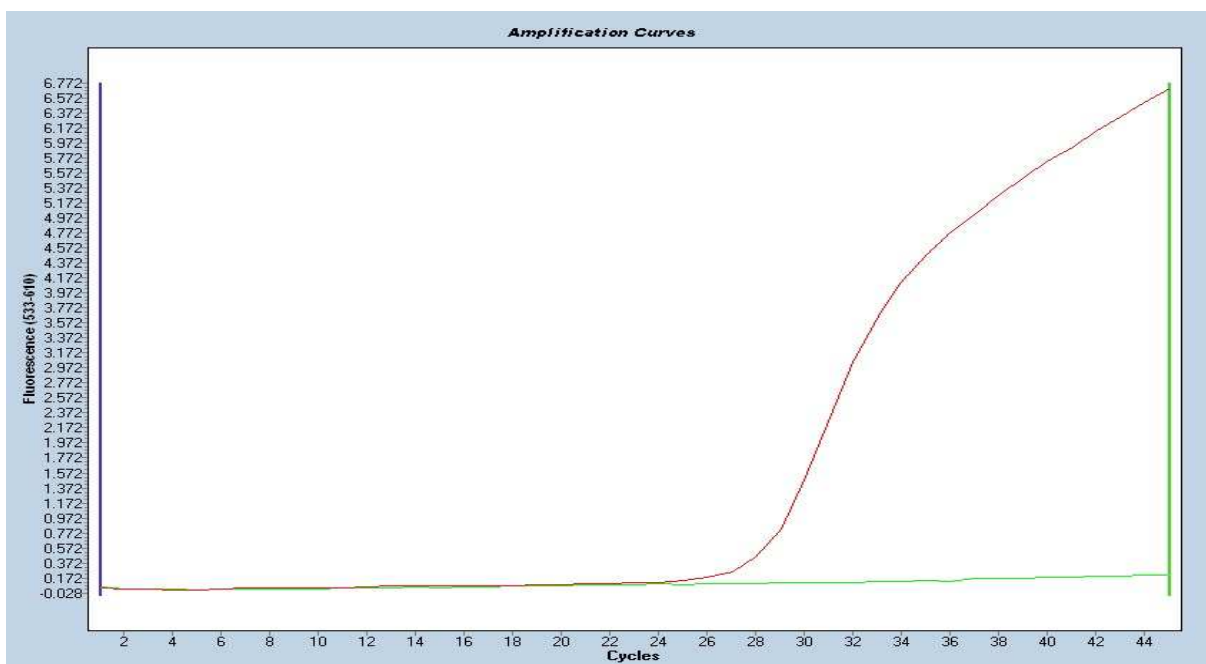
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

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

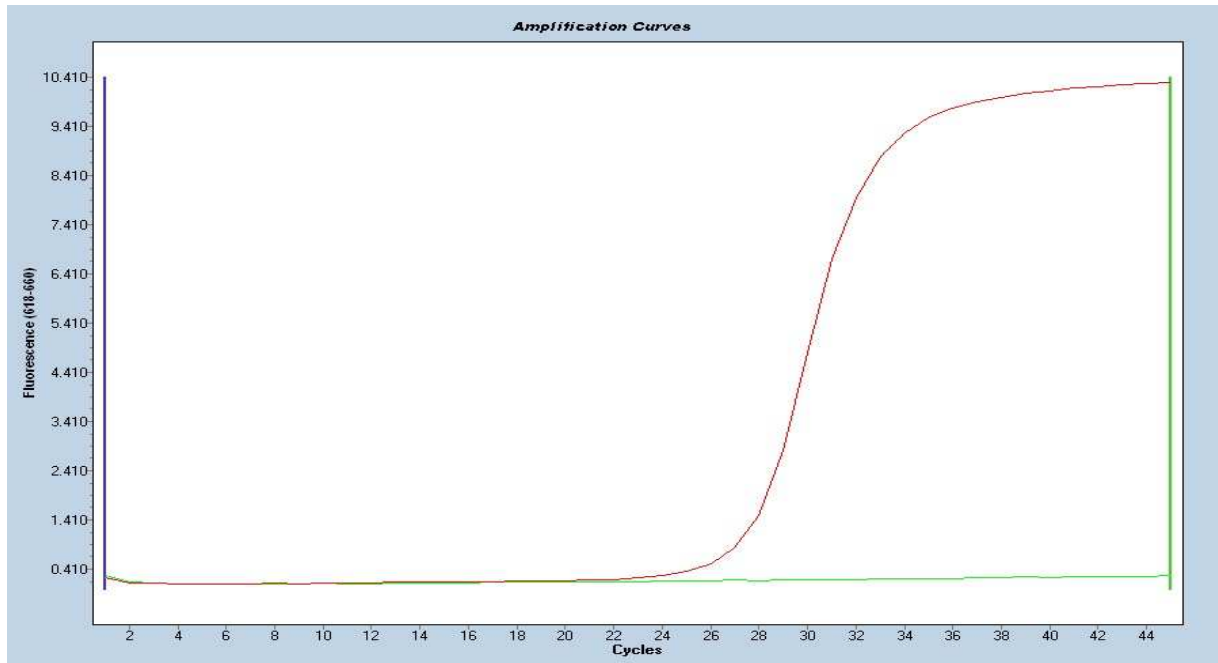
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



**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

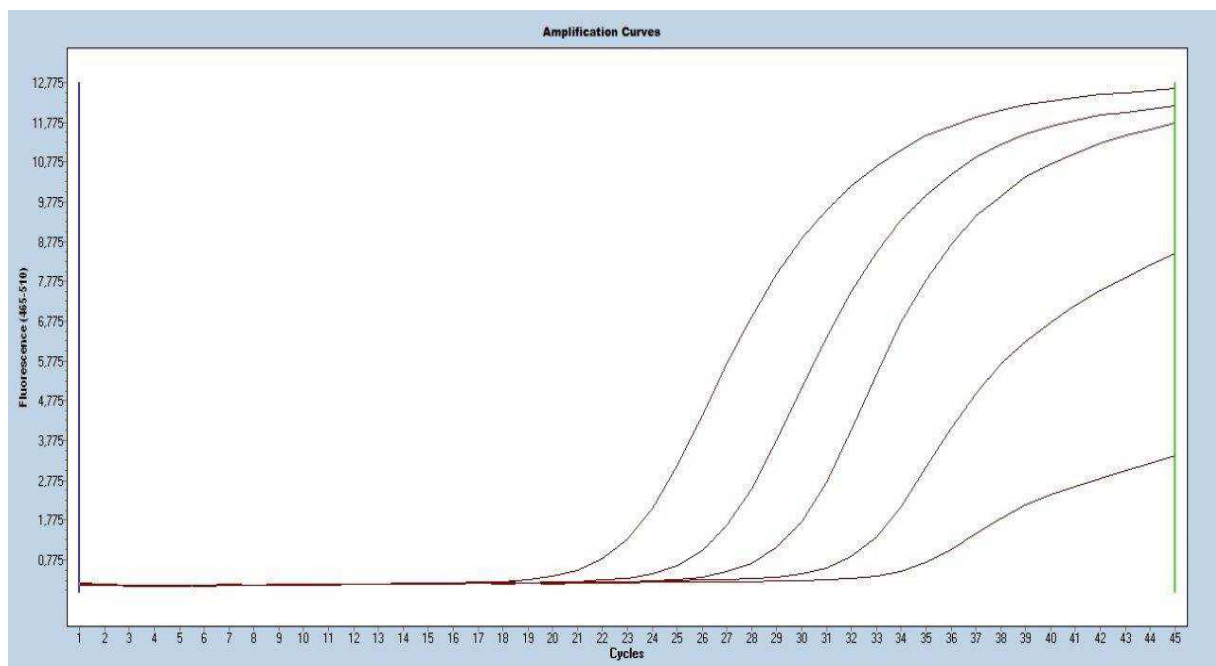
1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects 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

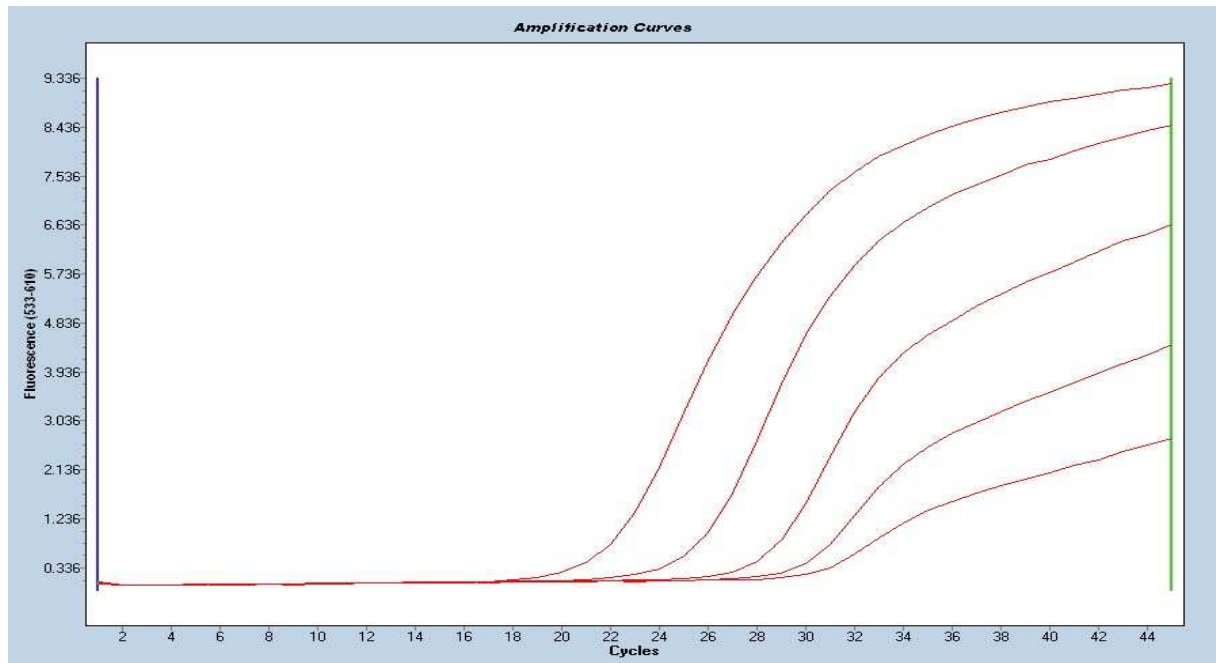
### 13.1 Sensibilité analytique

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*.

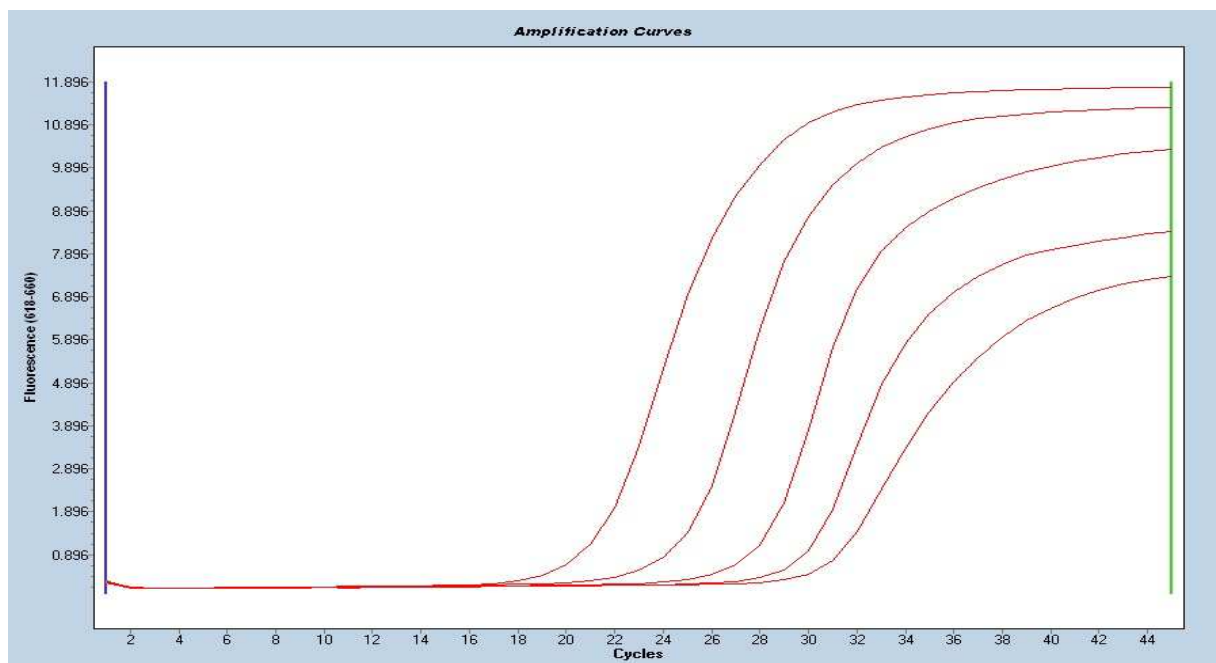
Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent les séries de dilution pour les norovirus et rotavirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$  chacune) et les gènes des toxines A/B de *Clostridium difficile* ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler<sup>®</sup> 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 2. Résumé et explication du test 4. Contenu du paquet 5. Instructions de conservation des réactifs 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 12. Limites de la méthode 13. Performances 14. Historique des versions 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



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

**REF** PG0705

## 1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel è un test RT-PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di norovirus (genogruppo I e II), rotavirus, e dei geni delle tossine A (tcdA)/B (tcdB) di *Clostridium difficile* in campioni fecali umani.

Il test RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time è adatto come ausilio nella diagnosi di gastroenterite nosocomiale.

## 2. Sintesi e spiegazione del test

La diarrea contratta in ospedale o diarrea nosocomiale è definita come episodio acuto di diarrea dopo 72 ore di ospedalizzazione (regola dei 3 giorni). Le cause della diarrea nosocomiale possono essere infettive o non infettive (ad esempio farmaci o chemioterapia); la condizione colpisce fino a un terzo dei pazienti ospedalizzati. La causa infettiva più comune di diarrea nosocomiale è il *Clostridium difficile*. Oltre a *Clostridium difficile* altre cause infettive predominanti sono norovirus e rotavirus. La diarrea nosocomiale può causare gravi complicanze nei pazienti e aumentare la durata e i costi della degenza ospedaliera.<sup>1,2,3,4</sup>

I norovirus sono la principale causa della maggior parte dei focolai epidemici di gastroenterite non batterica.<sup>5,6,7</sup> Una gastroenterite causata da norovirus si manifesta con nausea, vomito e diarrea. I norovirus sono escreti nelle feci e con il vomito. La trasmissione aerogena attraverso aerosol infetti è spesso la causa della rapidissima diffusione di questi virus nelle strutture condivise.<sup>8,9,10</sup> Il Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) stima che ogni anno negli Stati Uniti oltre 21 milioni di casi di gastroenterite acuta, 70.000 ricoveri e 800 decessi siano provocati da infezioni da norovirus.<sup>11</sup> I norovirus appartengono alla famiglia dei Caliciviridae e sono piccoli virus senza involucro con RNA a filamento singolo (ssRNA). **Possono essere raggruppati in 7 genogruppi, che attualmente contano oltre 30 genotipi e numerosi cladi. Finora, i patogeni umani sono stati descritti solo come appartenenti al genogruppo I (GI), con 9 genotipi, al genogruppo II (GII), con 22 genotipi e al genogruppo IV.**<sup>18,19</sup>

I rotavirus appartengono alla famiglia Reoviridae di RNA-virus (dsRNA) senza involucro, di forma icosaedrica, a doppio filamento, e sono classificati in 7 sierogruppi (A - G). Le infezioni umane sono causate solo dai sierogruppi A, B e C, anche se il sierogruppo A dei rotavirus rappresenta oltre il 90 % delle infezioni.<sup>12</sup> I sintomi

dell'infezione da rotavirus sono solitamente vomito, diarrea acquosa e dolore addominale. Il virus si trasmette per via oro-fecale attraverso le mani e altri oggetti contaminati. Il rotavirus è la principale causa di diarrea nei bambini di età inferiore ai cinque anni e si stima sia responsabile della morte di 611.000 bambini ogni anno nel mondo.<sup>13</sup>

*Clostridium difficile*, un batterio anaerobio gram-positivo, formante spore, è stato descritto per la prima volta nel 1935 da Hall e O'Toole come componente della microflora intestinale di neonati sani.<sup>14</sup> Alla fine degli anni '70, tuttavia, il *Clostridium difficile* è stato identificato come causa della diarrea associata alla terapia antibiotica e della colite pseudomembranosa.<sup>15</sup> Oggi, *Clostridium difficile* è una delle cause più comuni della diarrea nosocomiale. *Clostridium difficile* è responsabile del 15 - 25 % dei casi di diarrea associata alla terapia antibiotica e della quasi totalità dei casi di colite pseudomembranosa.<sup>16</sup> I fattori di rischio che predispongono alla CDAD sono, ad esempio, l'esposizione agli antibiotici, l'età avanzata, il numero e la durata dei ricoveri ospedalieri. Tuttavia, l'infezione da *Clostridium difficile* si riscontra anche in un numero crescente di soggetti non trattati con antibiotici e non ospedalizzati. I sintomi vanno dalla diarrea lieve alle infezioni intestinali di varia gravità, compresa la colite pseudomembranosa, la forma più grave di malattia infiammatoria intestinale indotta da antibiotici. I casi clinici sintomatici sono provocati dai ceppi tossigeni di *Clostridium difficile* che producono la tossina A e la tossina B. Negli ultimi anni, l'incidenza e la gravità delle infezioni da *Clostridium difficile* sono aumentate in tutto il mondo.<sup>17</sup>

La RT-PCR real-time permette una rilevazione rapida, estremamente sensibile e specifica della causa infettiva della diarrea. La diagnosi precoce e affidabile della diarrea causata da patogeni consente di somministrare terapie specifiche ai pazienti ospedalizzati e anche di attuare misure igieniche per prevenire la trasmissione nosocomiale.

### 3. Principio del test

RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel è un test di diagnostica molecolare RT-PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di norovirus (genogruppo I e II), rotavirus e dei geni delle tossine A (tcdA)/B (tcdB) di *Clostridium difficile* in campioni fecali umani.

La rilevazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase, durante la quale la PCR segue la trascrizione inversa nella stessa provetta di reazione. L'RNA isolato (norovirus, rotavirus) viene trascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa. I frammenti genetici specifici di norovirus (regione della giunzione ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3) e della tossina A/B (tcdA/tcdB) di *Clostridium difficile* vengono successivamente amplificati mediante PCR real-time. I target amplificati vengono rilevati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la Taq-Polymerase rompe la prossimità fra rilevatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rilevato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-

time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Hospital Stool Panel contiene un **Internal Control RNA** (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

#### 4. Contenuto della confezione

**Tabella 1:** Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrone
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

#### 5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a **20 cicli di congelamento/scongelamento** senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati in ambiente freddo, in modo appropriato (2 - 8 °C).

## 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari

Il test RIDA® GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per PCR real-time elencati di seguito:

**Tabella 2:** Attrezzatura necessaria

Piattaforme di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Avvertenze: Sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.**

Se si desidera utilizzare piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time diversi, contattare R-Biopharm all'indirizzo [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II e LightCycler® 480 z
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (priva di nucleasi)

## 7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test. Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose. Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si manipolano i campioni o i reagenti.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in locali separati per evitare contaminazione crociata.

- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.

Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Raccolta e conservazione di campioni

### 8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA/RNA da campioni fecali umani, utilizzare un kit di estrazione degli acidi nucleici disponibile in commercio (ad es. RIDA<sup>®</sup> Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione degli acidi nucleici (ad es. Maxwell<sup>®</sup> RSC (Promega)). Estrarre l'acido nucleico virale in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione si raccomanda di diluire i campioni fecali con acqua in rapporto 1:3. Vorticare vigorosamente il campione di feci diluito e centrifugare a 1000 x g per 30 secondi. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel contiene un **Internal Control RNA** che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e conferma che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'**Internal Control RNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo dell'inibizione della PCR.

Se l'**Internal Control RNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix (vedere Tabella 4).

Se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 20 µl di **Internal Control RNA** durante la procedura di estrazione. L'**Internal Control**

**RNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente ai campioni. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

## 9. Esecuzione del test

### 9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10% a compensazione di imprecisioni nel pipettaggio (vedere Tabella 3 e Tabella 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, l'**Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control RNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 - 8 °C).

**Tabella 3:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR come controllo di estrazione e di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme-Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
	<b>Totale</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

**Tabella 4:** Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	<b>Reaction Mix</b>	19,3 µl	212,3 µl
2	<b>Enzyme-Mix</b>	0,7 µl	7,7 µl
R	<b>Internal Control RNA</b>	1,0 µl	11 µl
	<b>Totale</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.



## 9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

**Controllo negativo:** dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo negativo.

**Campione:** dispensare 5 µl di eluato nella Master Mix pre-pipettata.

**Controllo positivo:** dispensare 5 µl di **Positive Control** nella Master Mix pre-pipettata.

**Avvertenze:** se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione RT-PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tabella 5, Tabella 6).

## 9.3 Impostazione dello strumento per PCR

### 9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

**Tabella 5:** Profilo universale RT-PCR real-time per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Tabella 6:** Profilo universale RT-PCR real-time per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

**Avvertenze:** l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

**Avvertenze:** il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time del DNA RIDA® GENE e dell'RNA RIDA® GENE vengono combinati in un unico ciclo.

## 9.4 Impostazione del canale di rilevazione

Tabella 7: Selezione dei canali di rilevazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rilevazione	Canale di rilevazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Tossina A/B di C. difficile	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	Tossina A/B di C. difficile	610/670	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Controllare che non vi sia il colorante di riferimento
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Tossina A/B di C. difficile	Cy5	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Tossina A/B di C. difficile	Cy5	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Tossina A/B di C. difficile	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Verde	Le impostazioni di amplificazione devono essere regolate su 5, in base alle impostazioni predefinite
	ICR	Giallo	
	Rotavirus	Arancione	
	Tossina A/B di C. difficile	Rosso	

## 10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, occorre che il controllo negativo e il controllo positivo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 8, Figura 1, Figura 2, Figura 3).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di  $10^3$  copie/ $\mu$ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di  $5 \times 10^3$  copie.

**Tabella 8:** Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICD	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA * <sup>1</sup>	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

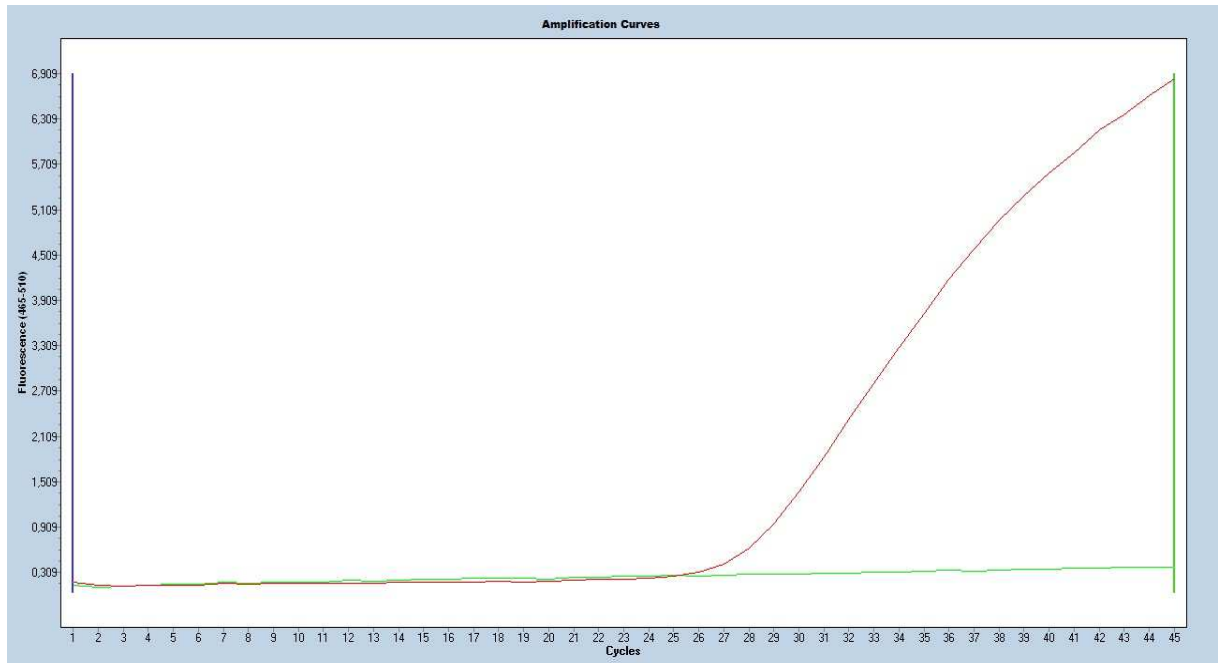
\*<sup>1</sup> Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

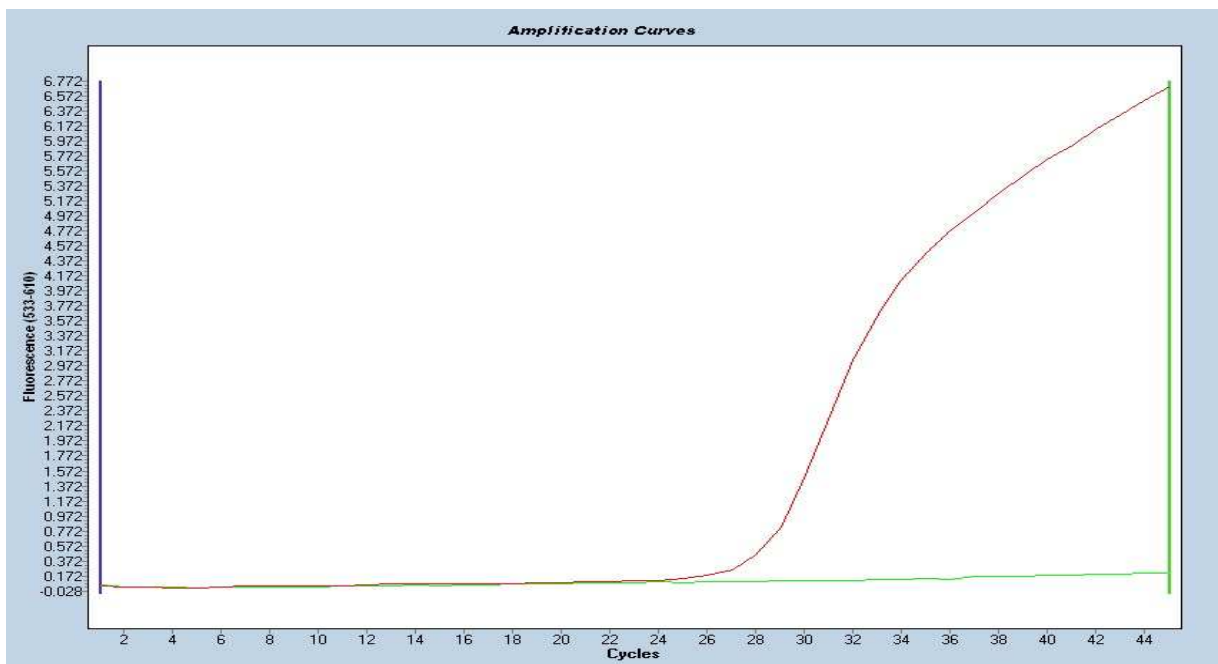
Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

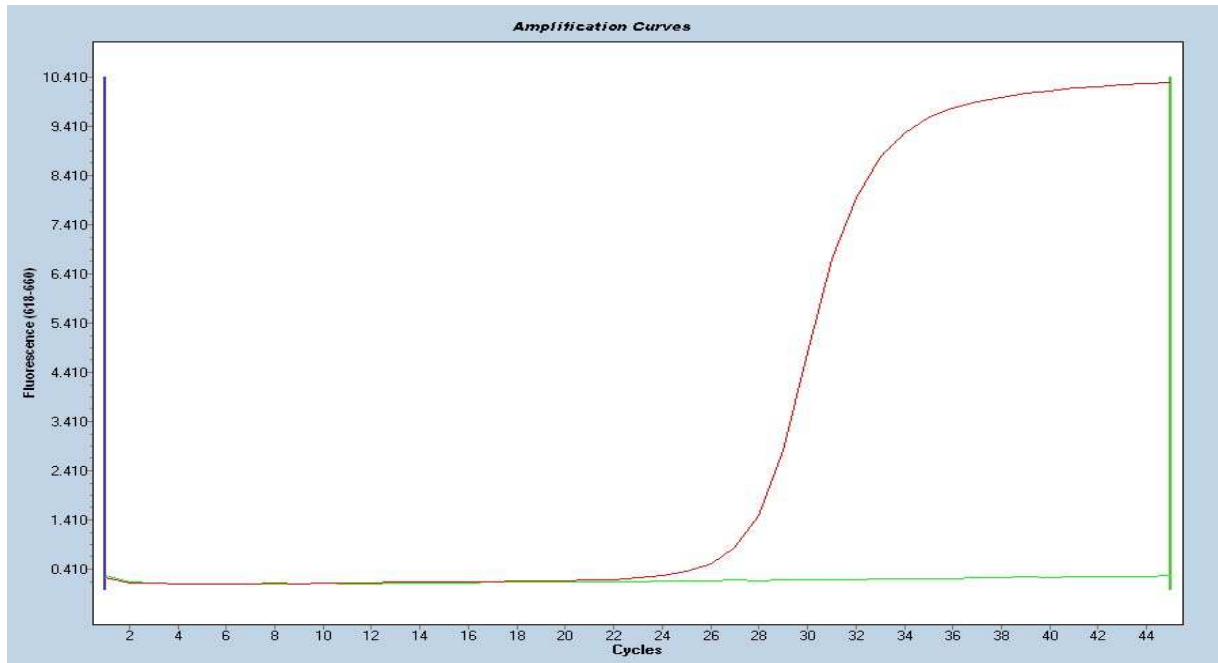
- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test



**Figura 1:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (norovirus) sul LightCycler® 480II



**Figura 2:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (rotavirus) sul LightCycler® 480II



**Figura 3:** Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (geni della tossina A/B di *C. difficile*) sul LightCycler® 480II

## 11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

**Tabella 9:** Interpretazione del campione

Rilevazione				
Norovirus	Rotavirus	Gene della tossina A/B di <i>C. difficile</i>	ICR/ICD	Risultato
<b>Positivo</b>	Negativo	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Norovirus rilevato</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Rotavirus rilevato</b>
Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevata</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Norovirus e rotavirus rilevati</b>
Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Rotavirus e tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevati</b>
<b>Positivo</b>	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Norovirus e tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevati</b>
<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo</b>	<b>Positivo/Negativo</b>	<b>Norovirus, rotavirus e tossina A/B di <i>C. difficile</i> rilevati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>Geni target non rilevati</b>
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<b>Non valido</b>

Un campione è valutato come positivo se sia l'RNA del campione sia l'**Internal Control RNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rilevazione.

Un campione è valutato come positivo anche se l'RNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'**Internal Control RNA** nel sistema di rilevazione. La rilevazione dell'**Internal Control RNA** non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'**Internal Control RNA** sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'**Internal Control RNA** nel sistema di rilevazione. La rilevazione dell'**Internal Control RNA** esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control** **RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rilevazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

## 12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni fecali.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o una carica virale nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre risultati falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rilevazione di nuovi genotipi di norovirus con il test RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel e causare un falso negativo.
6. Come per tutti i test diagnostici in vitro basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rilevazione (LoD) possono essere rilevati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza dei geni target corrispondenti (norovirus: regione della giunzione ORF1/ORF2, rotavirus: gene NSP3, tossina A/B di *Clostridium difficile*: tcdA/tcdB).
8. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel può rilevare anche i norovirus del genogruppo IV, che infettano gli esseri umani molto raramente.
9. Il test RIDA<sup>®</sup>GENE Hospital Stool Panel non può rilevare i rotavirus del sierogruppo B e C.

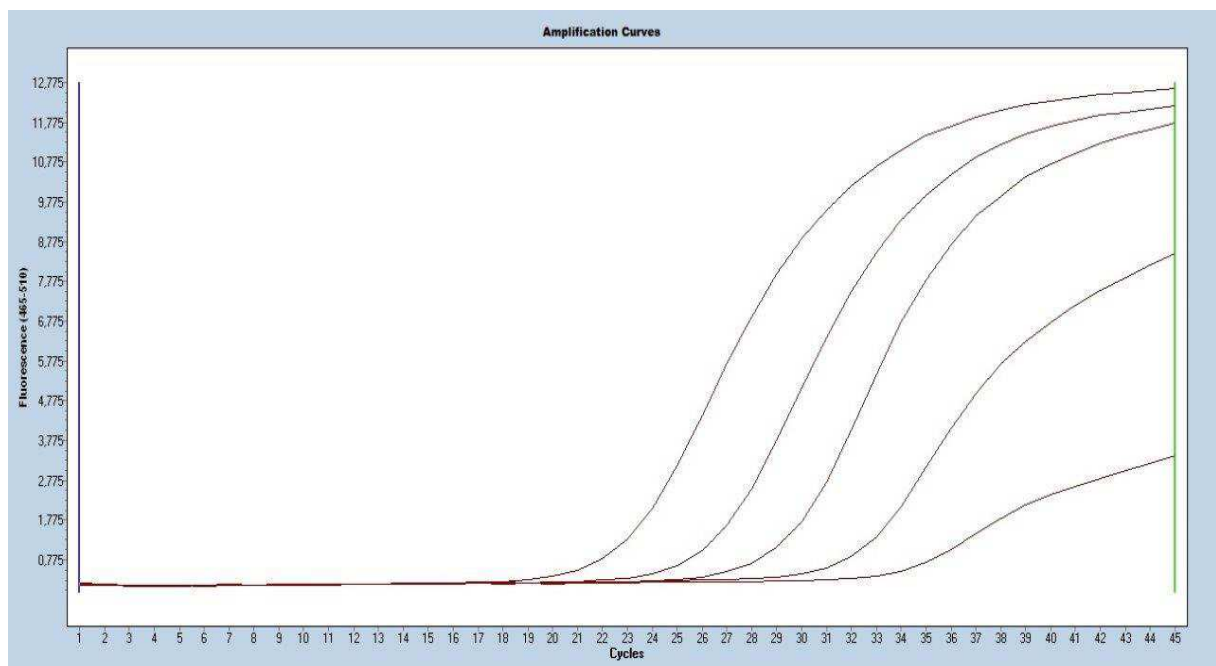


## 13. Prestazioni e caratteristiche

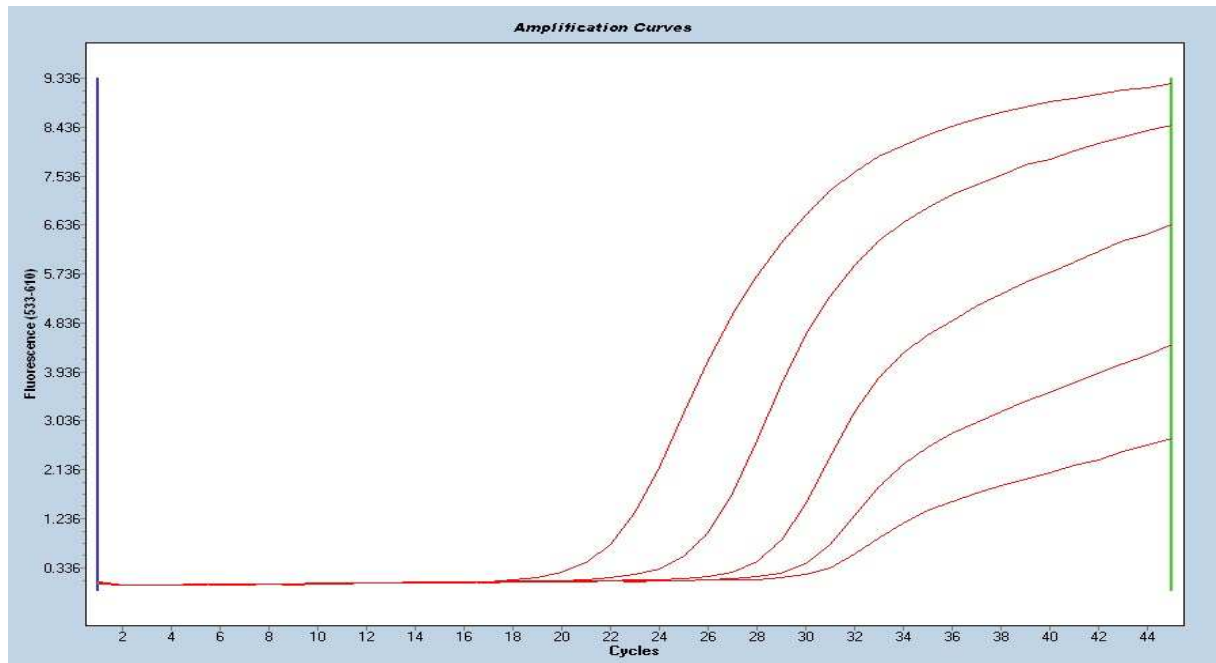
### 13.1 Sensibilità analitica

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA<sup>®</sup> GENE Hospital Stool Panel ha un limite di rilevazione  $\geq 50$  copie per reazione per norovirus, rotavirus e geni della tossina A/B di *Clostridium difficile*.

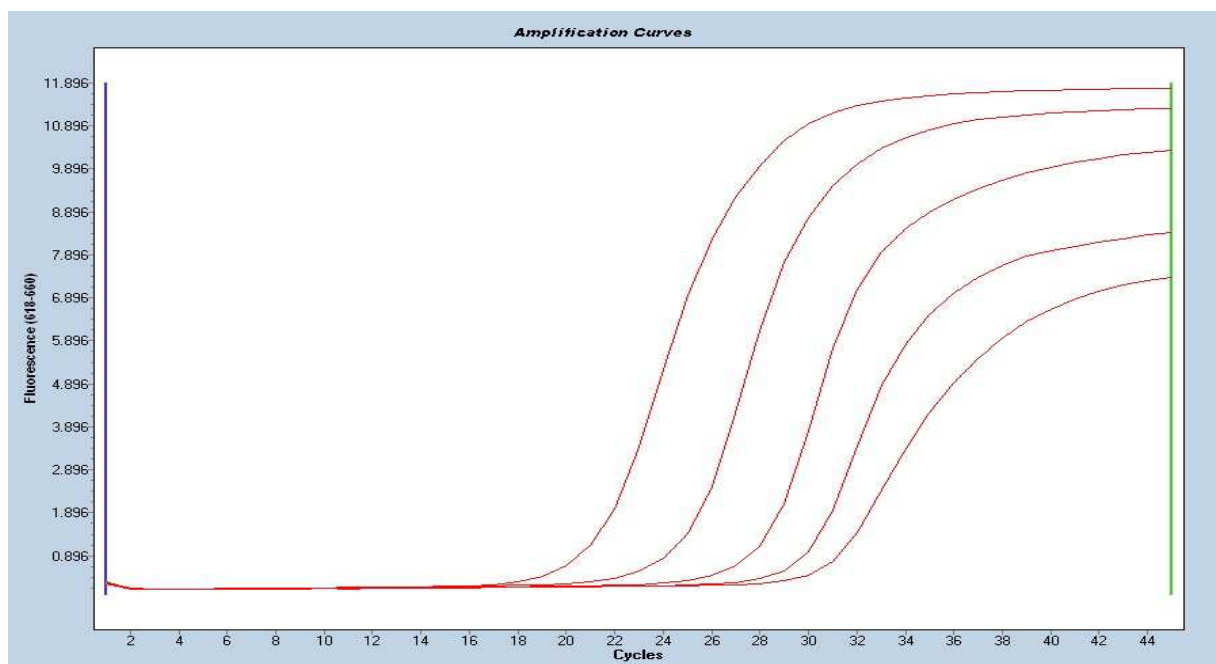
Le seguenti figure 4, 5 e 6 mostrano le serie di diluizioni di norovirus, rotavirus (ogni  $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) e dei geni della tossina A/B di *Clostridium difficile* ( $10^5 - 10^1$  copie di DNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Figura 4:** Serie di diluizioni di norovirus ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Figura 5:** Serie di diluizione di rotavirus ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Figura 6:** Serie di diluizioni dei geni della tossina A/B di *Clostridium difficile* ( $10^5 - 10^1$  copie di RNA per  $\mu\text{l}$ ) sul LightCycler<sup>®</sup> 480II.

Il limite di rilevazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione dell'acido nucleico e dalla concentrazione dell'acido nucleico.

## 13.2 Specificità analitica

Il test RIDA® GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex è specifico per norovirus (genogruppi I, II e IV), rotavirus (sierogruppo A) e geni della tossina A/B di *Clostridium difficile*. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tabella 10):

**Tabella 10:** Test di reattività crociata

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo 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 bifirmentans</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 Reattività analitica

La reattività del test RIDA® GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex è stata valutata rispetto a più genotipi dei genogruppi I, II e IV di norovirus e diversi sierotipi delle specie di rotavirus A (vedere Tabella 11). Tutti i genotipi di norovirus e i sierotipi di rotavirus del panel sono stati rilevati da RIDA® GENE Hospital Stool Panel RT-PCR real-time multiplex.

**Tabella 11:** Test di reattività analitica










Norovirus					
<b>Genogruppo I</b>					
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	+
<b>Genogruppo II</b>					
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	+		
<b>Genogruppo IV</b>					
GIV.1 – Alphanon	+				
Rotavirus					
<b>Sierogruppo A</b>					
Sierotipo G1	+	Sierotipo G2	+	Sierotipo G3	+
Sierotipo G4	+	Sierotipo G9	+	Sierotipo G12	+

## 14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-09-20	Revisione generale 2. Sintesi e spiegazione del test 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti e dispositivi aggiuntivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

## 15. Descrizione dei simboli

### Simboli generali

	Diagnostica in vitro
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

### Simboli specifici nel test

Non pertinente

## 16. Bibliografia

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