

RIDA® GENE Viral Stool Panel III

REF PG1335



Deutsch	3
English.....	23
Español.....	43
Français.....	63
Italiano	83

RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III

REF PG1335

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Norovirus, Rotavirus und Adenovirus 40/41 in humanen Stuhlproben.^{1,2,3}

Die RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch gastrointestinales Viren verursachten Gastroenteritis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Die akute Gastroenteritis ist weltweit eine der Hauptursachen von Morbidität und Mortalität. Enterale Viren sind vor allem bei Kindern die häufigste Ursache einer Gastroenteritis. In den Vereinigten Staaten verursachen virale Infektionen jährlich schätzungsweise 30,8 Millionen Fälle von Gastroenteritis.⁴ Die wichtigsten viralen Durchfallerreger sind Noro-, Rota-, und Adenoviren.

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae* und sind einzelsträngige RNA (ssRNA) Viren. Eine noroviral-bedingte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Noroviren werden sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden.⁵ 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, aus der Genogruppe II (GGII) mit 22 Genotypen und aus der Genogruppe IV (GGIV) mit 2 Genotypen beschrieben.^{6,7} Es wird geschätzt, dass in den USA jedes Jahr über 21 Millionen Fälle von akuter Gastroenteritis, 70.000 Krankenhausaufenthalte und 800 Todesfälle durch Noroviren verursacht werden.⁶

Rotaviren gehören zur Familie der *Reoviridae*. Es handelt sich dabei um unbehüllte ikosaedrische doppelsträngige RNA (dsRNA) Viren. 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 Diarrhoe und weltweit verantwortlich für den Tod von schätzungsweise 611.000 Kindern jährlich.⁸ Rotaviren werden in 7 Serogruppen A – G unterteilt, wobei die Erreger der Serogruppe A die größte epidemiologische Bedeutung besitzen.⁹

Adenoviren sind unbehüllte ikosaedrische doppelsträngige DNA (dsDNA) Viren und gehören zur Familie der *Adenoviridae*. Man unterscheidet 56 humanpathogene Adenovirus Serotypen, die in sieben Gruppen (A - G) unterteilt werden. Adenoviren verursachen überwiegend Erkrankungen der Atemwege, während die Serotypen 40 und 41 hauptsächlich Gastroenteritiden hervorrufen.^{10,11}

3. Testprinzip

Die RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR ist eine molekular-diagnostische PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Norovirus-RNA, Rotavirus-RNA und Adenovirus 40/41-DNA 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 wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Norovirus (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3) und Adenovirus (Hexon) spezifischen Genfragmente 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 optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 Testeigenschaften 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 Viral Stool Panel III multiplex real-time 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, LightCycler [®] 480 z
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

- RIDA[®]GENE ColorCompensation 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
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-freies)

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.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 DNA/RNA-Präparation aus Stuhlproben

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

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:10 mit PCR-Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 1 min bei 13.000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III 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 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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

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	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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

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 RNA-Extrakt 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 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	
	Adenovirus	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	Adenovirus	610/670	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein
	ICR	Yellow	
	Rotavirus	Orange	
	Adenovirus	Red	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	

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 für Norovirus, Rotavirus und Adenovirus in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 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 * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

*¹ Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, 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

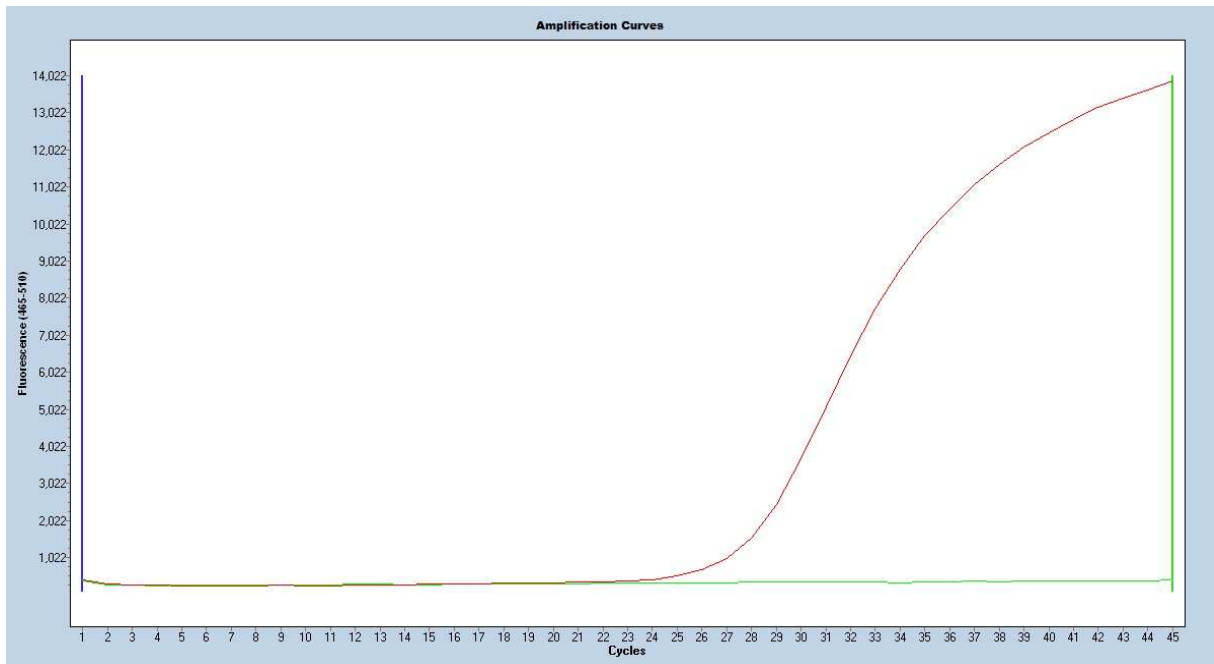


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Norovirus) auf dem LightCycler® 480II

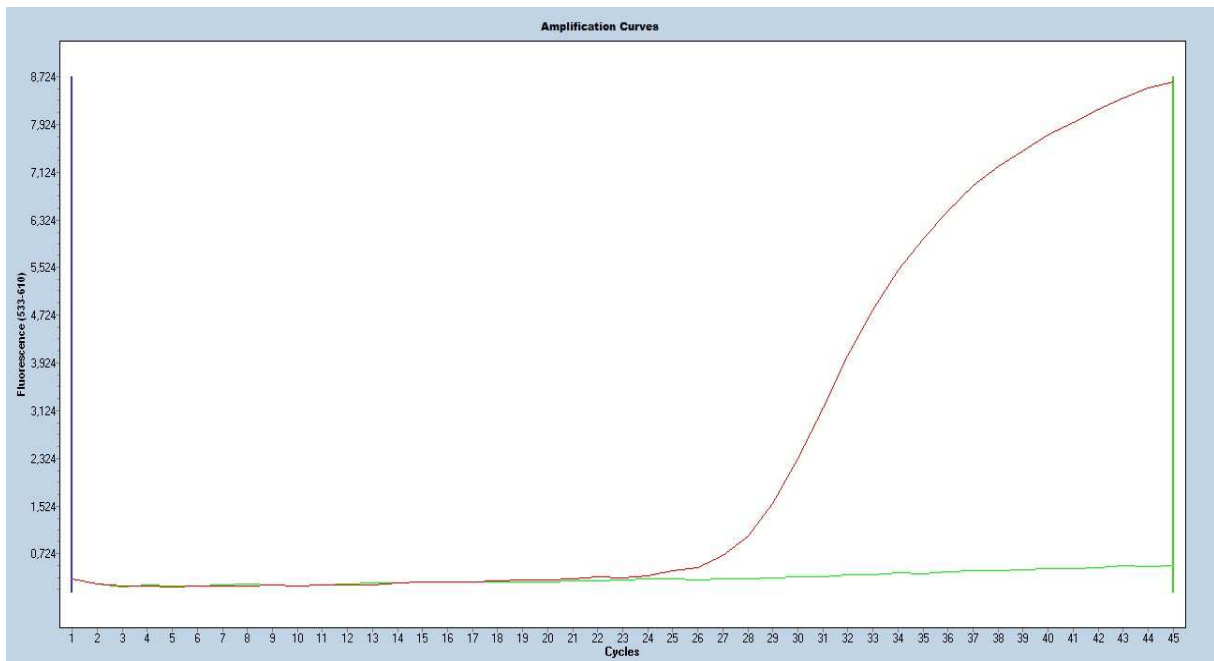


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Rotavirus) auf dem LightCycler® 480II

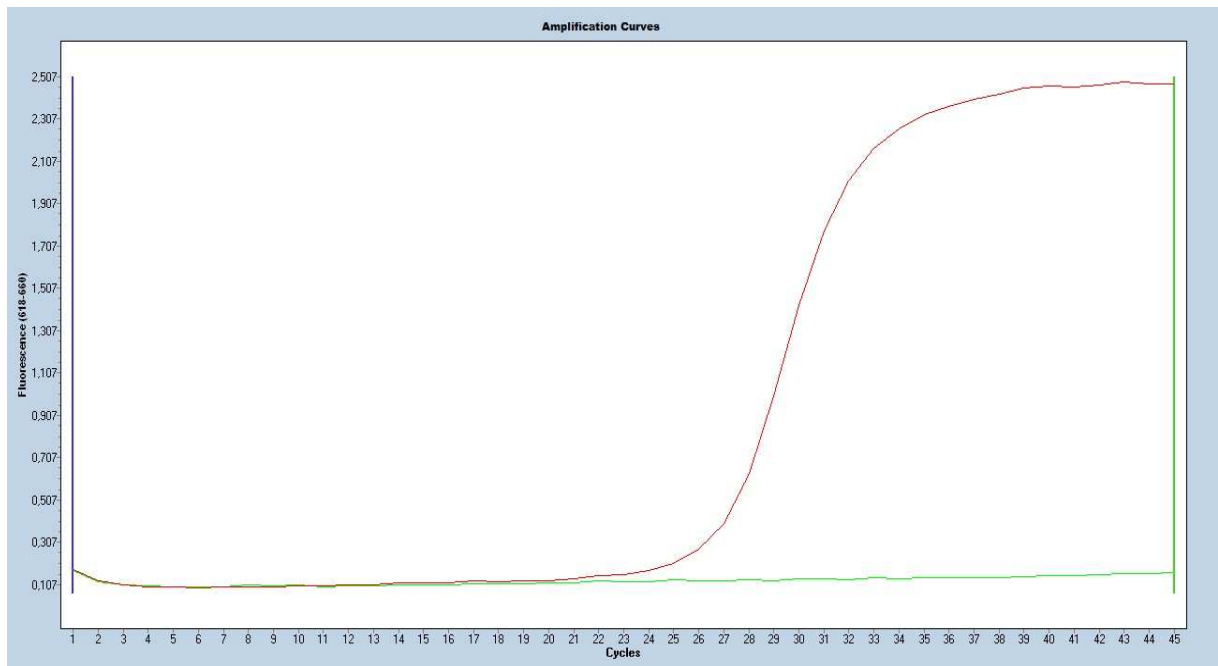


Abb. 3: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Adenovirus) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Probenauswertung

Zielgene			ICR	Ergebnis
Norovirus	Rotavirus	Adenovirus		
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	Norovirus nachweisbar
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	Rotavirus nachweisbar
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	Adenovirus nachweisbar
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	Norovirus und Rotavirus nachweisbar
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	Norovirus und Adenovirus nachweisbar
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	Rotavirus und Adenovirus nachweisbar
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	Norovirus, Rotavirus und Adenovirus nachweisbar
negativ	negativ	negativ	positiv	Zielgene nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	Ungültig

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die **Internal Control RNA** im Nachweissystem zu sehen ist.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die **Internal Control RNA** im Nachweissystem zeigt. 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-RNA keine Amplifikation, aber die **Internal Control RNA** eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control RNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA 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. Der RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 Zielgene (Norovirus (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3), Adenovirus (Hexon)) vorhanden sind.
8. Mit RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III werden ausschließlich die Adenovirus-Serotypen 40 und 41, welche hauptsächlich Gastroenteritiden hervorrufen, nachgewiesen. Die Serotypen 1, 2, 5, 6, 12, 18, und 31, die in den seltensten Fällen Verursacher einer akuten Diarrhoe sind, werden nicht mit dem RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III Test erfasst.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA® GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion.

Die folgenden Abbildungen 4, 5 und 6 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von Norovirus und Rotavirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) und Adenovirus ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II.

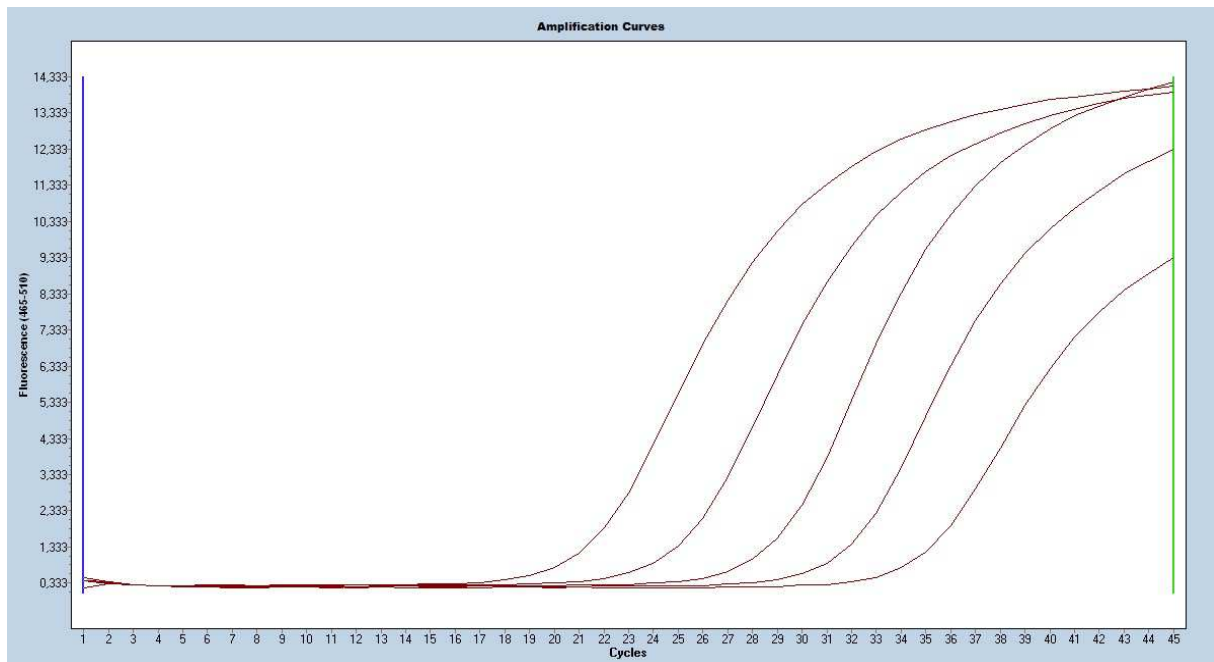


Abb.4: Verdünnungsreihe Norovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

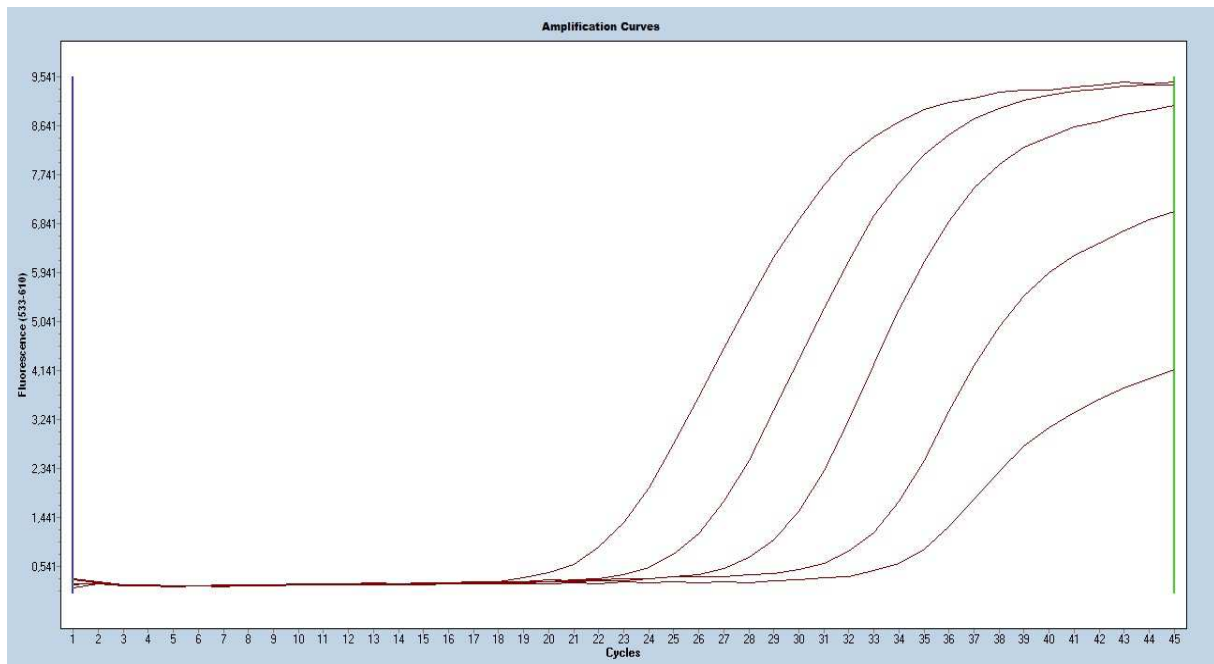


Abb.5: Verdünnungsreihe Rotavirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

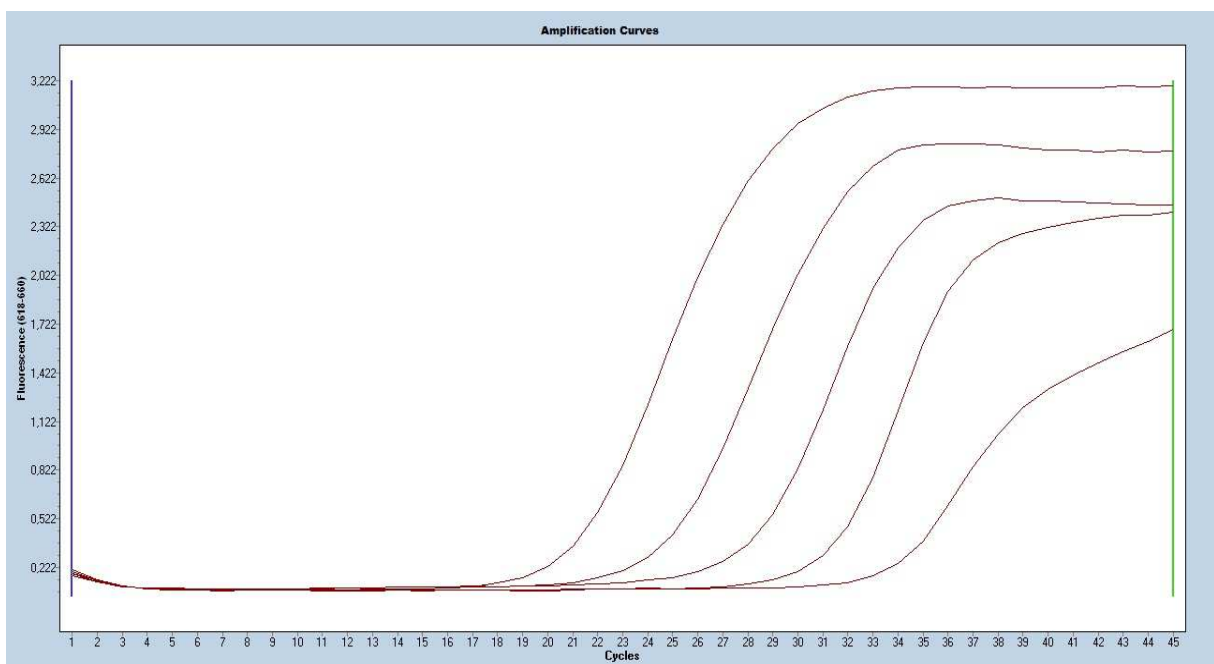


Abb.6: Verdünnungsreihe Adenovirus ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, DNA-/RNA-Extraktion und DNA-/RNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Norovirus, Rotavirus und Adenovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.10):

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus type: 4	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus type: 5	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus type: 7A	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus type: 11	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus type: 31	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Adenovirus type: 37	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Astrovirus type 2	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Astrovirus type 8	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR wurde mit Noroviren, Rotaviren und Adenoviren, die vorher mit einer anderen Methode positiv bestimmt wurden, untersucht (s. Tab.11). Alle Noroviren, Rotaviren, und Adenoviren des Probenpanels wurden mit der RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR nachgewiesen.

Tab.11: Analytische Reaktivitätstestung










Norovirus					
Genogruppe I					
GGI.1 - Norwalk	+	GGI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 – Hesse	+
GGI.2 - Southhampton, Southhampton	+	GGI.4 – Chiba, Malta	+	GGI.7 – Winchester	+
GGI.2 - Southhampton, Whiterose	+	GGI.5 - Musgrove	+	GGI.8 – Boxer	+
Genogruppe II					
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	+	GII.c – Den Haag	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 – Erfurt	+		
Genogruppe IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				
Rotavirus					
Serogruppe A					
Serotyp G1	+	Serotyp G2	+	Serotyp G3	+
Serotyp G4	+	Serotyp G9	+	Serotyp G12	+
Adenovirus					
Serotyp 40	+	Serotyp 41	+		

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-08-10	Freigabeversion

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. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
6. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
7. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical. Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
8. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
9. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8. Aufgerufen am 09.07.2018.
10. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
11. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.

RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III

REF PG1335

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III is a multiplex real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of Norovirus, Rotavirus and Adenovirus 40/41 in human stool samples.^{1,2,3}

The RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR is intended for use as an aid in diagnosis of gastroenteritis caused by Norovirus, Rotavirus and Adenovirus, respectively.

2. Summary and explanation of the test

Acute Gastroenteritis is one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Especially in children, enteral viruses are the primary cause of gastroenteritis. In the US, viral infections cause approximately 30.8 million cases of gastroenteritis, yearly.⁴ The most important pathogens causing diarrhea are Norovirus, Rotavirus and Adenovirus.

Noroviruses belong to the family of *Caliciviridae* and are single-stranded RNA (ssRNA) viruses. Gastroenteritis caused by norovirus is manifested by severe nausea, vomiting and diarrhoea. Noroviruses are egested by stool and with the vomit.⁵ 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 (GIV) with two genotypes.^{6,7} In the US, it is estimated, that more than 21 million cases of acute gastroenteritis, 70,000 hospitalisations and 800 deaths are caused by norovirus infections each year.⁵

Rotaviruses belong to the *Reoviridae* family of non-enveloped icosahedral double-stranded RNA (dsRNA) viruses. Symptoms of rotavirus infection are usually vomiting, watery diarrhoea and abdominal pain. The virus is transmitted by the fecal-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.⁸ Rotaviruses are classified in seven serogroups A – G, whereby the viruses of serogroup A are of major epidemiologic importance.⁹

Adenoviruses belong to the *Adenoviridae* family of non-enveloped icosahedral double-stranded (dsDNA) viruses. One differentiates 56 serotypes of human adenoviruses and they are classified into seven groups (A - G). Adenoviruses mainly

cause respiratory diseases, whereas Gastroenteritis is primarily caused by serotype 40 and 41.^{10,11}

3. Test principle

The RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR is a molecular diagnostic test for the direct, qualitative detection and differentiation of Norovirus RNA, Rotavirus RNA and Adenovirus 40/41 DNA from 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 is transcribed into cDNA by a reverse transcriptase. Gene fragments specific for Norovirus (ORF1/ORF2 junction region), Rotavirus (NSP3) and Adenovirus (Hexon) 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[®]GENE Viral Stool Panel III assay contains an **Internal Control RNA** (ICR) as an internal control of sample preparation procedure and 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[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platform	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Real-time PCR instrument:	
Roche	LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Use on the Rotor-Gene Q (QIAGEN) only 0.1 ml tubes.

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

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) to run the LightCycler[®] 480II and the LightCycler[®] 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 (BioScience grade, 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

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[®] Xtract (R-Biopharm)) or nucleic acid extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract viral nucleic acid according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool sample before extraction 1:10 with water. Vortex intensely and centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Use from the supernatant an appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 (s. Tab. 4).

If the Internal Control RNA is used as a 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	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme-Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

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	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme-Mix	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

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 RNA-Extract 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 Gerät	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	
	Adenovirus	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	Adenovirus	610/670	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Check that the reference dye is none
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	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	
	Adenovirus	Red	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	

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** for norovirus, rotavirus and adenovirus has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

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

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

*¹ 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

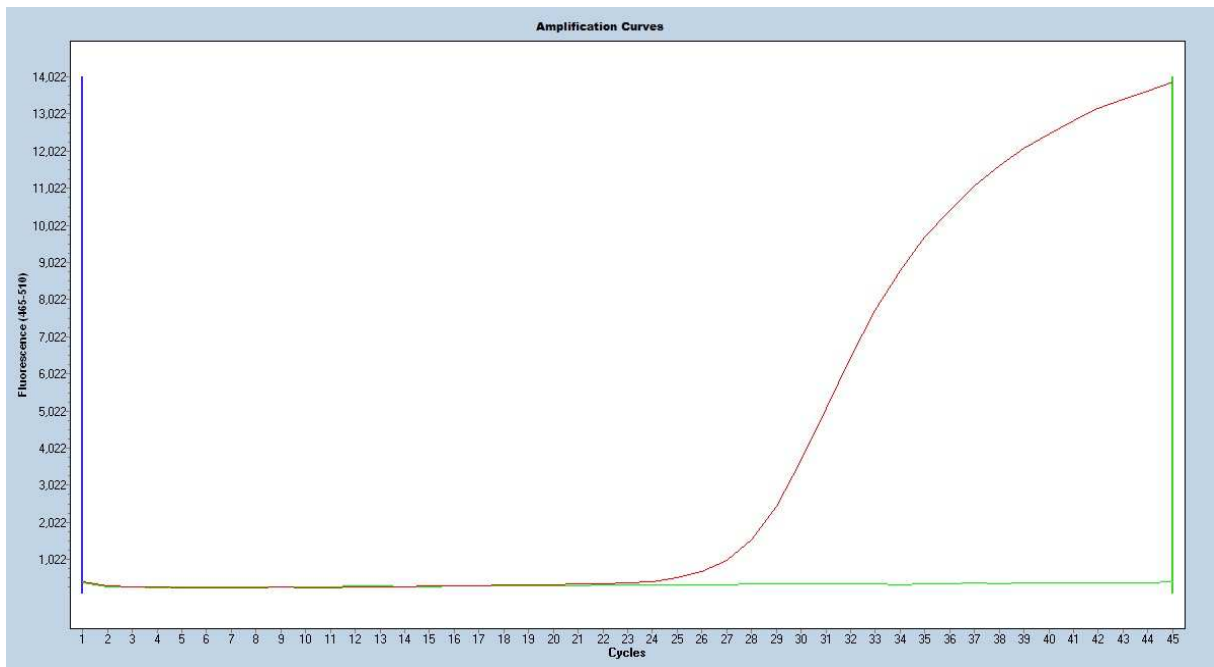


Fig. 1: Correct run of the positive control and negative control (Norovirus) on the LightCycler® 480II

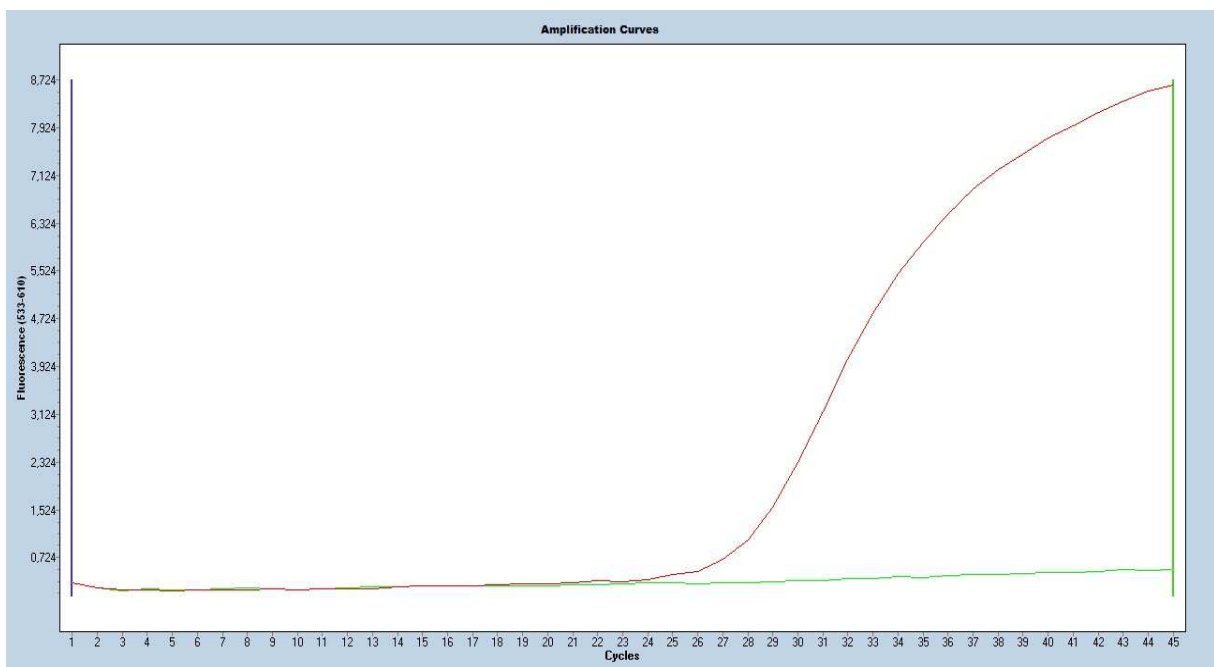


Fig. 2: Correct run of the positive control and negative control (Rotavirus) on the LightCycler® 480II

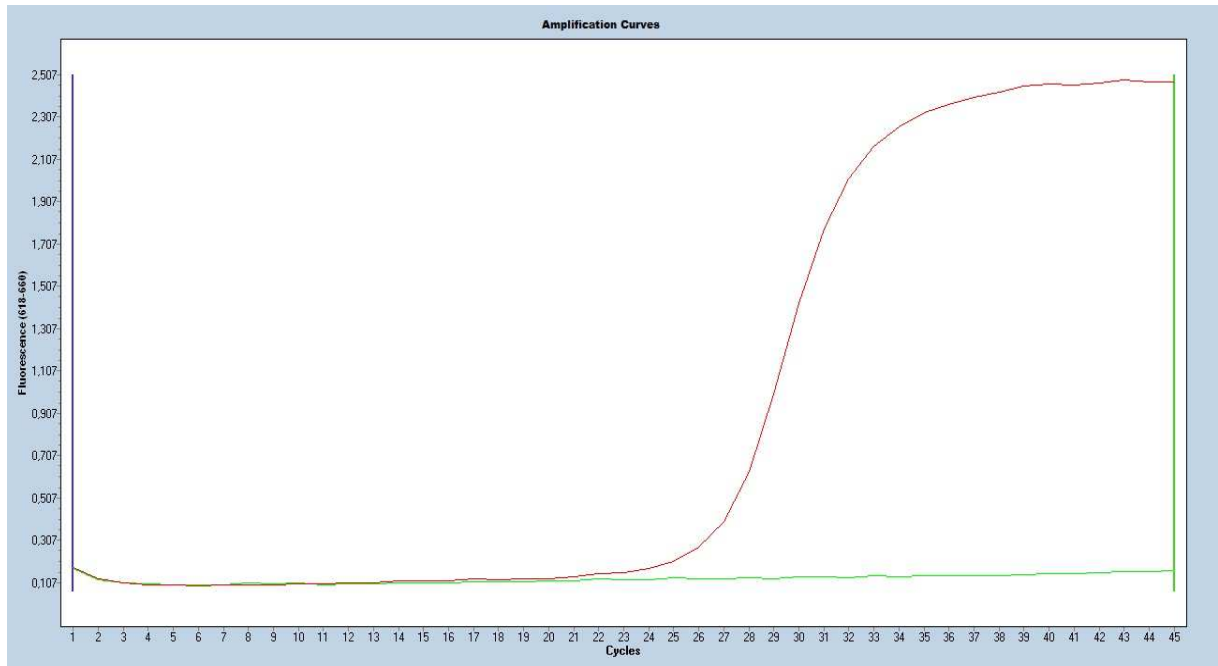


Fig. 3:Correct run of the positive control and negative control (Adenovirus) on the LightCycler[®] 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 9.

Tab. 9: Sample interpretation

Target genes			ICR	Result
Norovirus	Rotavirus	Adenovirus		
positive	negative	negative	positive/negative	Norovirus detected
negative	positive	negative	positive/negative	Rotavirus detected
negative	negative	positive	positive/negative	Adenovirus detected
positive	positive	negative	positive/negative	Norovirus and rotavirus detected
positive	negative	positive	positive/negative	Norovirus and adenovirus detected
negative	positive	positive	positive/negative	Rotavirus and adenovirus detected
positive	positive	positive	positive/negative	Norovirus, rotavirus and adenovirus detected
negative	negative	negative	positive	Target genes not detected
negative	negative	negative	negative	Invalid

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. The RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III assay 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 new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 target genes (Norovirus (ORF1/ORF2 junction Region), Rotavirus (NSP3), Adenovirus (Hexon)).
8. With RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III the Adenovirus serotypes 40 und 41, which cause primarily Gastroenteritis, are detected only. The serotypes 1, 2, 5, 6, 12, 18, und 31 are rarely associated with acute diarrhea and not detected by RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III assay.

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time RT-PCR has a detection limit of ≥ 50 RNA copies per reaction.

The following figures 4, 5 and 6 show dilution series of Norovirus and Rotavirus ($10^5 - 10^1$ RNA copies per μl) and of Adenovirus ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

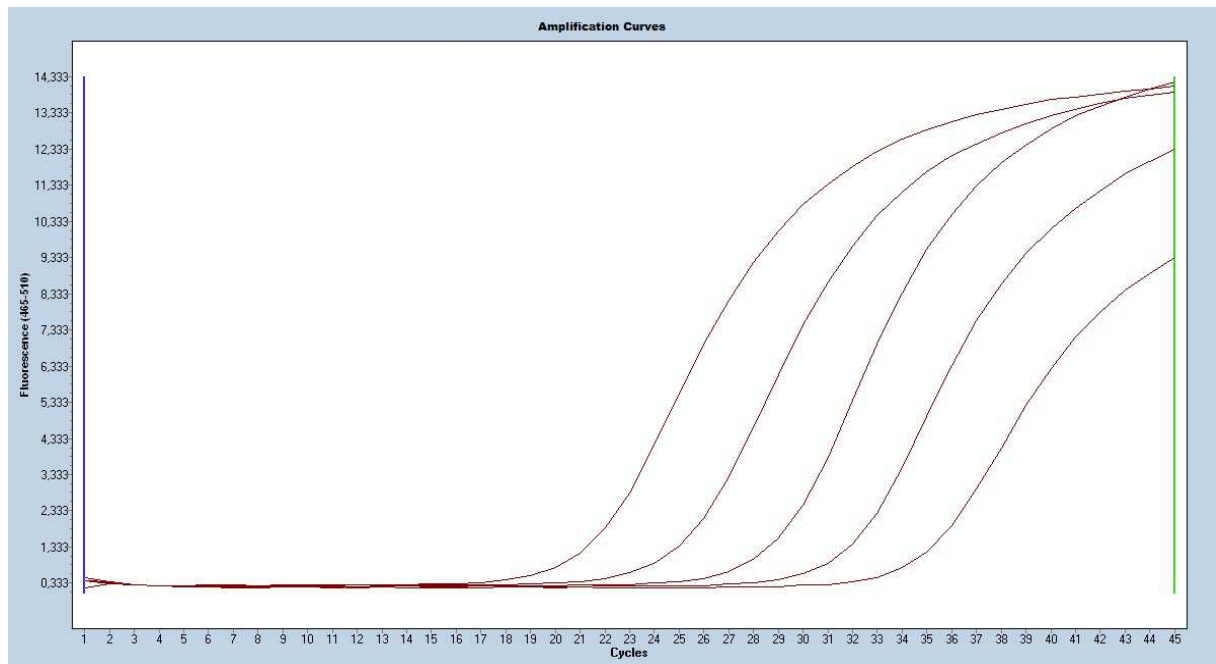


Fig. 4: Dilution series Norovirus ($10^5 - 10^1$ RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

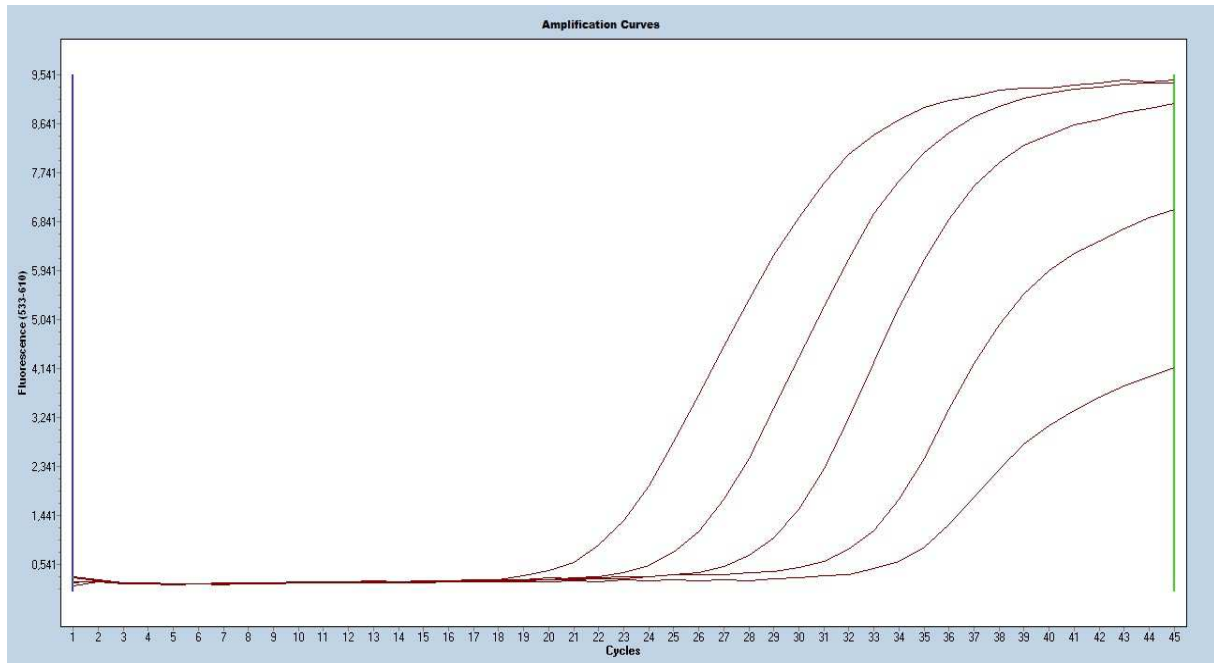


Fig. 5: Dilution series Rotavirus ($10^5 - 10^1$ RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

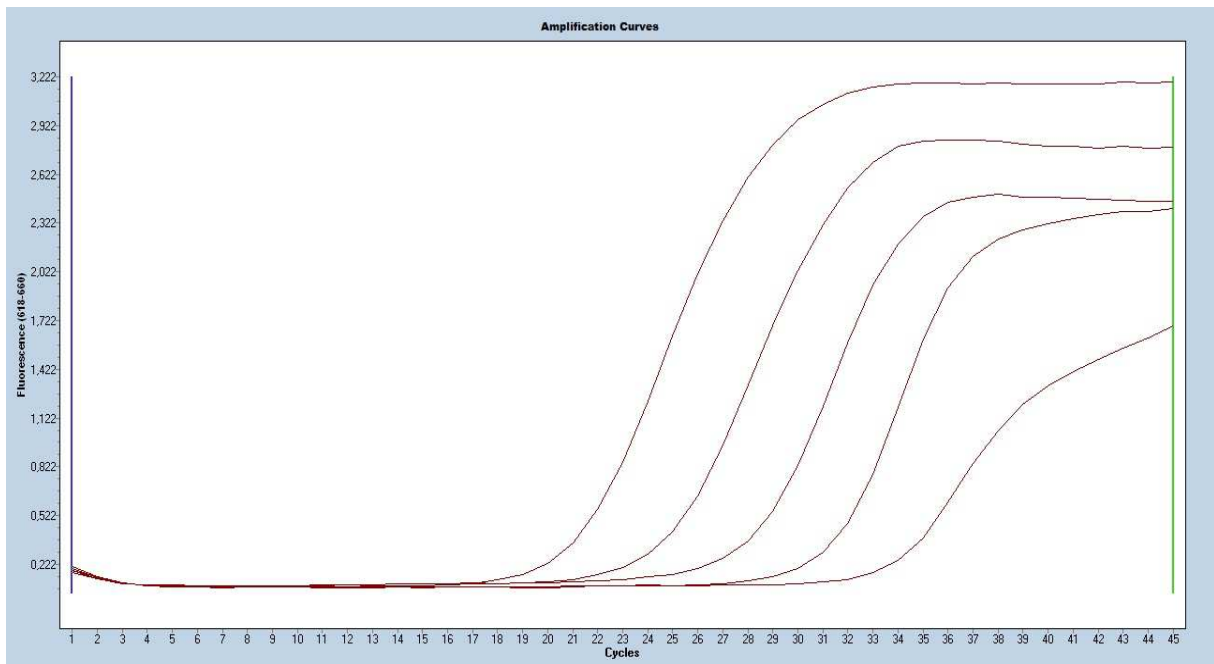


Fig. 6: Dilution series Adenovirus ($10^5 - 10^1$ DNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, DNA/RNA extraction and DNA/RNA concentration.

13.2 Analytical specificity

The analytical specificity of the RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time PCR is specific for Norovirus, Rotavirus and Adenovirus. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab.10):

Tab. 10: Cross-reactivity testing

Adenovirus type: 4	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Adenovirus type: 5	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Adenovirus type: 7A	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus type: 11	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus type: 31	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Adenovirus type: 37	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Astrovirus type 2	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Astrovirus type 8	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time PCR was evaluated against previously positive characterized Norovirus, Rotavirus and Adenovirus samples (see Tab. 10). All tested viruses were detected by the RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III multiplex real-time PCR assay.

Tab.11: Analytical reactivity testing (number of samples tested)










Norovirus					
Genogroup I					
GGI.1 - Norwalk	+	GGI.3 - Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 - Hesse	+
GGI.2 - Southhampton, Southhampton	+	GGI.4 - Chiba, Malta	+	GGI.7 - Winchester	+
GGI.2 - Southhampton, Whiterose	+	GGI.5 - Musgrove	+	GGI.8 - Boxer	+
Genogroup II					
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	+	GII.c - Den Haag	+
GGII.4 - Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 - Erfurt	+		
Genogroup IV					
GGIV.1 - Alphanon	+				
Rotavirus					
Serogroup A					
Serotype G1	+	Serotype G2	+	Serotype G3	+
Serotype G4	+	Serotype G9	+	Serotype G12	+
Adenovirus					
Serotype 40	+	Serotype 41	+		

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2018-08-10	Release version

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. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
5. Centers for Disease Control and Prevention. *Norovirus: Overview 2012*.
6. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
7. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical. Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
8. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
9. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8. Aufgerufen am 09.07.2018.
10. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
11. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.

RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III

REF PG1335

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de norovirus, rotavirus y adenovirus 40/41 en muestras de heces humanas.^{1,2,3}

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III está concebido como una ayuda para el diagnóstico de gastroenteritis causada por norovirus, rotavirus y adenovirus, respectivamente.

2. Resumen y descripción del ensayo

La gastroenteritis aguda es una de las causas principales de morbimortalidad en todo el mundo. Especialmente en los niños, los virus entéricos son la causa principal de gastroenteritis. En los EE. UU., las infecciones virales causan aproximadamente 30.8 millones de casos de gastroenteritis cada año.⁴ Los patógenos más importantes que causan diarrea son los norovirus, rotavirus y adenovirus.

Los norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae* y son virus de ARN monocatenario (ARNmc). La gastroenteritis causada por norovirus se manifiesta por náuseas, vómitos y diarrea importantes. Los norovirus se expulsan en las heces y los vómitos.⁵ 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) con dos genotipos.^{6,7} En los Estados Unidos, se calcula que las infecciones por norovirus causan más de 21 millones de casos de gastroenteritis aguda, 70,000 hospitalizaciones y 800 muertes cada año.⁵

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* de virus de ARN bicatenario (ARNbc) icosaédricos sin envoltura. 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 los objetos contaminados. Los rotavirus son la causa principal de diarrea en niños menores de cinco años y se calcula que son los responsables de la muerte de unos 611,000 niños cada año en todo el mundo.⁸ Los rotavirus se clasifican en siete serogrupos (A a G); de estos, los virus del serogrupo A tienen una gran importancia epidemiológica.⁹

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* de virus de ADN bicatenario (ADNbc) icosaédricos sin envoltura. Se pueden diferenciar 56 serotipos de

adenovirus humanos, que se clasifican en siete grupos (A a G). Los adenovirus causan principalmente enfermedades respiratorias, mientras que la gastroenteritis se debe principalmente a los serotipos 40 y 41.^{10,11}

3. Principio del ensayo

La RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Viral Stool Panel III es un ensayo de diagnóstico molecular para la diferenciación y la detección cualitativa directa de ARN de norovirus y rotavirus, y ADN de adenovirus 40/41 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 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 adenovirus (exón) 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 Viral Stool Panel III 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	1,050 µl	amarillo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rojo
R	Internal Control RNA	2x	1,700 µl	café
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Control positivo	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 a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar 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 Viral Stool Panel III es adecuado para usarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipo necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
Equipo 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: Use únicamente tubos de 0.1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

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

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II y el LightCycler® 480 z
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0.5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, 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 del ensayo. 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 del ensayo. No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.

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

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

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

8. Obtención y almacenamiento de muestras

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ADN/ARN de muestras de heces humanas, use un kit de extracción de ácidos nucleicos (p. ej. RIDA[®] Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ácido nucleico viral siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:10 con agua antes de la extracción. Mezcle la muestra en un agitador de vórtex a alta velocidad y centrifúguela a 13,000 x g durante 1 min. Use el volumen de sobrenadante adecuado, según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 debe

agregar 20 µl de **Internal Control RNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control RNA** debe agregarse siempre a la mezcla de la solución amortiguadora de lisado de muestras, y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución del ensayo

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 deben incluirse un control positivo y un control negativo.

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

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

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme-Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

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

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

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme-Mix	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

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

9.2 Preparación de la mezcla de PCR

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

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

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

Muestra: Agregue 5 µl de extracto de ARN 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, 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	
	Adenovirus	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	
	Adenovirus	610/670	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Verde	La ganancia debe configurarse en 5, según la configuración predeterminada.
	ICR	Amarillo	
	Rotavirus	Naranja	
	Adenovirus	Rojo	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	

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** para norovirus, rotavirus y adenovirus tiene una concentración de 10^3 copias/ μ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

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

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

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

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

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

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

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta del ensayo

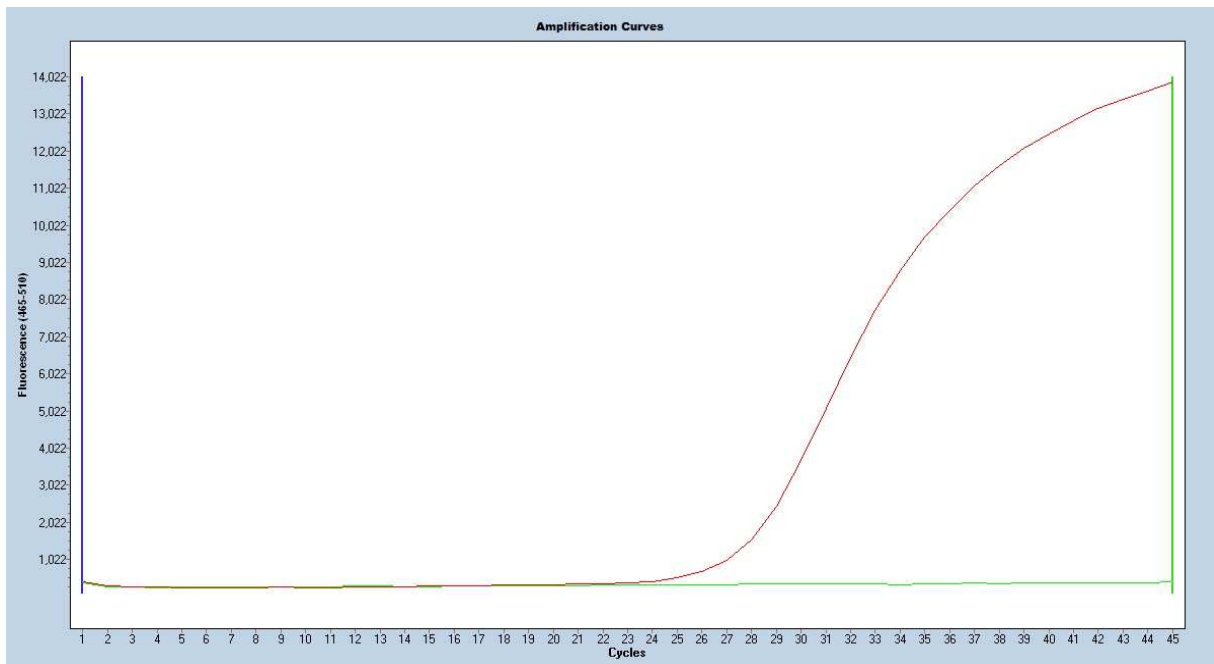


Fig. 1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (norovirus) en el LightCycler® 480II

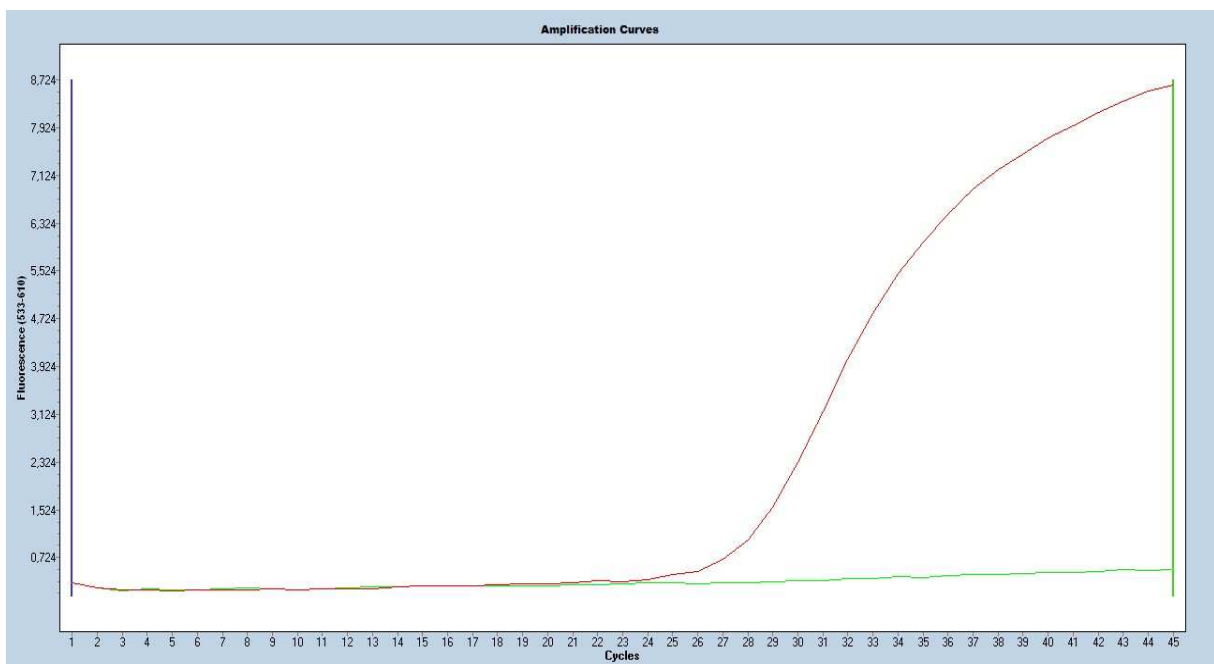


Fig. 2: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (rotavirus) en el LightCycler® 480II

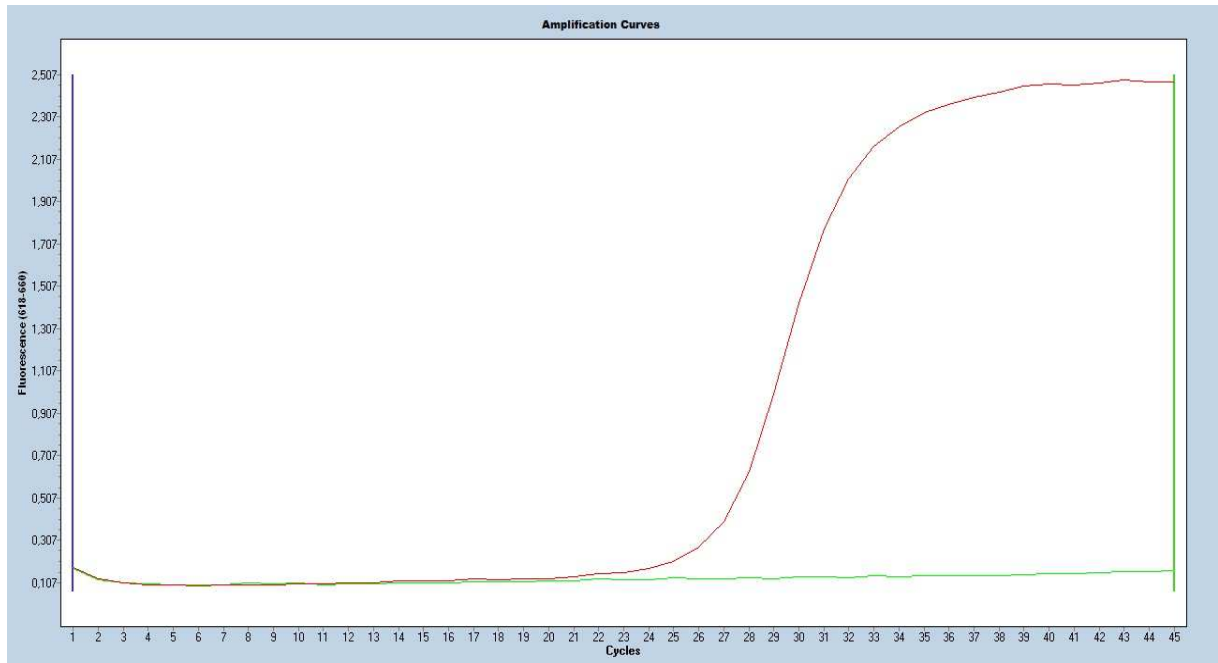


Fig. 3: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (adenovirus) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

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

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Genes diana			ICR	Resultado
Norovirus	Rotavirus	Adenovirus		
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	Norovirus detectado
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	Rotavirus detectado
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	Adenovirus detectado
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	Norovirus y rotavirus detectados
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	Norovirus y adenovirus detectados
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	Rotavirus y adenovirus detectados
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	Norovirus, rotavirus y adenovirus detectados
negativo	negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	negativo	No válido

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

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

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

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

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. El ensayo RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III 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 nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III.
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 (LoD), 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 (norovirus [región de unión ORF1/ORF2], rotavirus [NSP3], adenovirus [exón]).
8. Con RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III, solo se detectan los serotipos 40 y 41 de adenovirus, que causan principalmente gastroenteritis. Los serotipos 1, 2, 5, 6, 12, 18 y 31 rara vez se asocian con diarrea aguda y, por lo tanto, el ensayo RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III no los detecta.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

La RT-PCR multiplex en tiempo real de RIDA® GENE Viral Stool Panel III tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de ARN por reacción.

Las siguientes figuras 4, 5 y 6 muestran una dilución seriada de norovirus y rotavirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μl) y adenovirus (10^5 a 10^1 copias de ADN por μl) en el LightCycler® 480II.

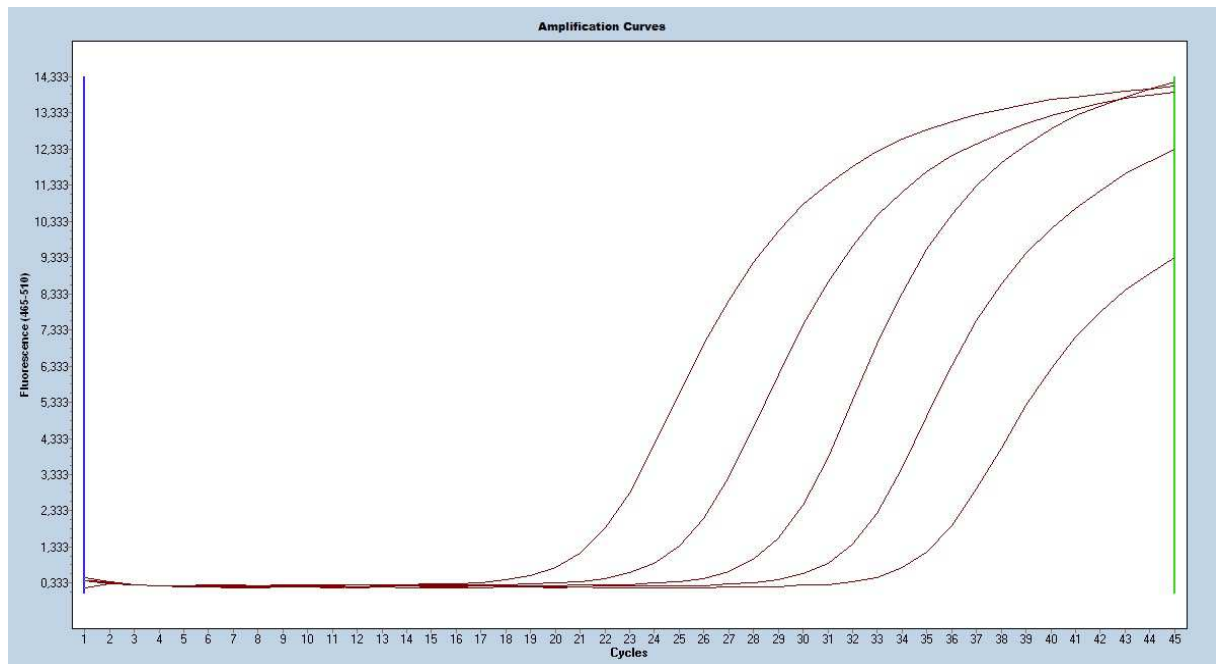


Fig. 4: Dilución seriada de norovirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

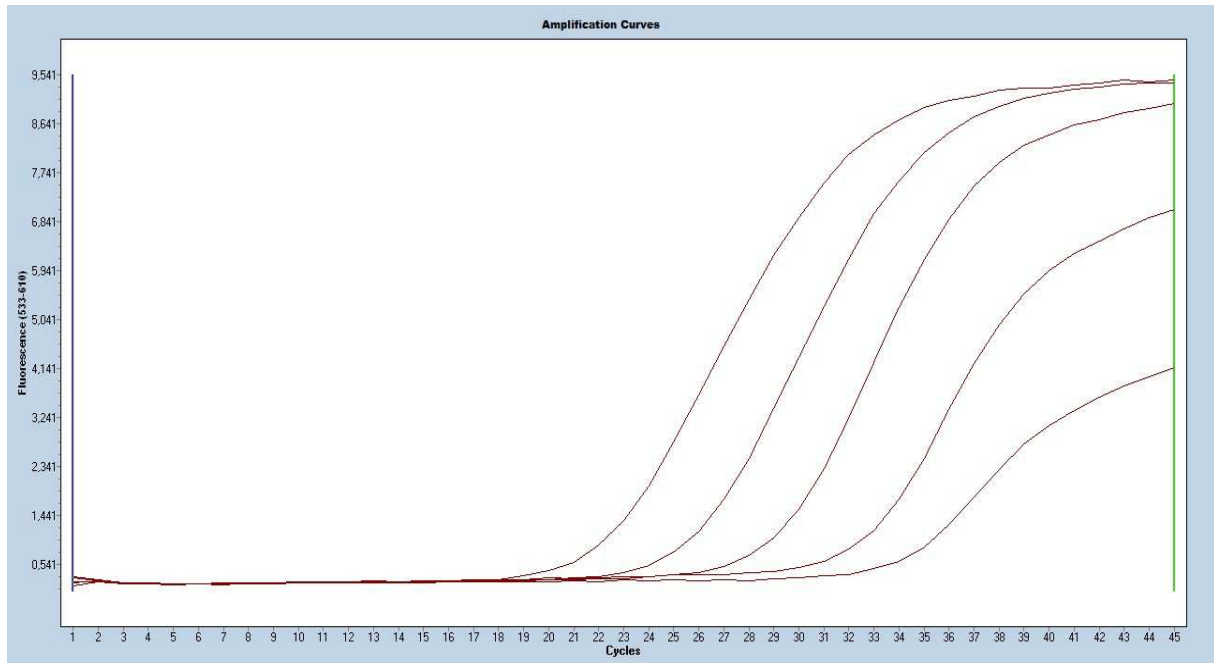


Fig. 5: Dilución seriada de rotavirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μ l) en el LightCycler® 480II

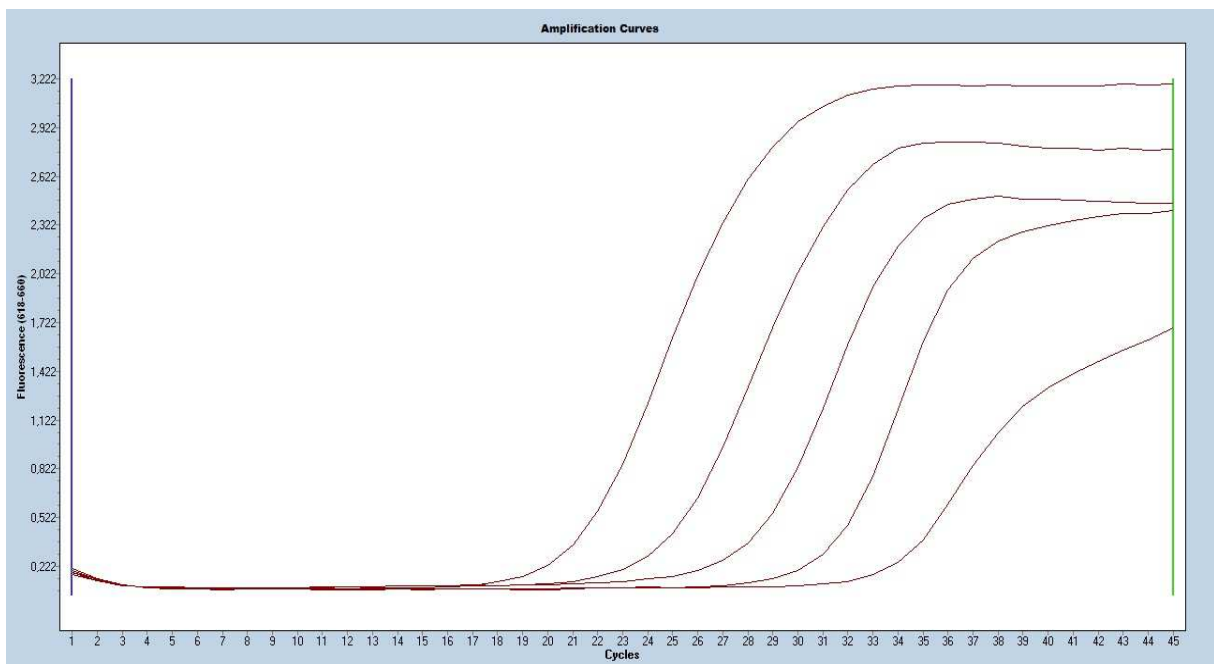


Fig. 6: Dilución seriada de adenovirus (10^5 a 10^1 copias de ADN por μ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ADN/ARN y la concentración de ADN/ARN.

13.2 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Viral Stool Panel III es específica para norovirus, rotavirus y adenovirus. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 10):

Tabla 10: Ensayos de reactividad cruzada

Tipo de adenovirus: 4	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Tipo de adenovirus: 5	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Tipo de adenovirus: 7A	-	<i>Campylobacter fetus</i> subespecie <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Tipo de adenovirus: 11	-	<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Tipo de adenovirus: 31	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Tipo de adenovirus: 37	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Astrovirus tipo 2	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Astrovirus tipo 8	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Reactividad analítica

La reactividad de la PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Viral Stool Panel III se evaluó con muestras de norovirus, rotavirus y adenovirus previamente caracterizadas como positivas (consulte la tabla 10). Todos los virus evaluados se detectaron con el ensayo de PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Viral Stool Panel III.

Tabla 11: Pruebas de reactividad analítica (número de muestras analizadas)










Norovirus					
Genogrupo I					
GGI.1 - Norwalk	+	GGI.3 - Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 - Hesse	+
GGI.2 - Southhampton, Southhampton	+	GGI.4 - Chiba, Malta	+	GGI.7 - Winchester	+
GGI.2 - Southhampton, Whiterose	+	GGI.5 - Musgrove	+	GGI.8 - Boxer	+
Genogrupo II					
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	+	GII.c - La Haya	+
GGII.4 - Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 - Erfurt	+		
Genogrupo IV					
GGIV.1 - Alphanon	+				
Rotavirus					
Serogrupo A					
Serotipo G1	+	Serotipo G2	+	Serotipo G3	+
Serotipo G4	+	Serotipo G9	+	Serotipo G12	+
Adenovirus					
Serotipo 40	+	Serotipo 41	+		

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-08-10	Versión de lanzamiento

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i>
	Consulte las instrucciones de uso.
	Número de lote
	Caducidad
	Almacene a
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Bibliografía

1. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
6. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
7. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical. Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
8. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
9. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8. Aufgerufen am 09.07.2018.
10. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
11. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.

RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III

REF PG1335

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de norovirus, rotavirus et adénovirus 40/41 dans des échantillons de selles humaines.^{1,2,3} Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III est destiné à faciliter le diagnostic de la gastroentérite causée par norovirus, rotavirus et adénovirus, respectivement.

2. Résumé et explication du test

La gastro-entérite aiguë est la principale cause de morbidité et de mortalité dans le monde entier. Les virus entéraux sont la principale cause de la gastro-entérite, en particulier chez les enfants. Aux États-Unis, les infections virales sont responsables d'environ 30,8 millions de cas de gastro-entérite chaque année⁴. Les agents pathogènes les plus importants à l'origine de diarrhées sont les norovirus, les rotavirus et les adénovirus.

Les norovirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae* et sont des virus à ARN simple brin (ARNsb). Une gastro-entérite 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.⁵ 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) qui compte deux génotypes.^{6,7} On estime que, chaque année, plus de 21 millions de cas de gastro-entérite aiguë, 70 000 hospitalisations et 800 décès sont provoqués par des infections à norovirus aux États-Unis⁵.

Les rotavirus appartiennent à la famille des *Reoviridae* de virus sans enveloppe de structure icosaédrique et à ARN double brin (ARNdb). 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 est responsable de la mort d'environ 611 000 enfants dans le monde entier selon les estimations⁸. Les rotavirus sont classés en sept

sérogroupe (A à G), ceux du sérogroupe A étant ceux qui sont les plus importants du point de vue épidémiologique⁹.

Les adénovirus appartiennent à la famille des *Adenoviridae* de virus sans enveloppe de structure icosaédrique et à ADN double brin (ADNdb). On répertorie 56 sérotypes d'adénovirus humains, classés en sept groupes (A à G). Ils provoquent principalement des maladies respiratoires, tandis que la gastro-entérite est provoquée par les sérotypes 40 et 41^{10,11}.

3. Principe du test

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III est un test de diagnostic moléculaire pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN des norovirus, rotavirus et de l'ADN 40/41 des adénovirus 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 est transcrit en ADNc par une transcriptase inverse. Des fragments de gène spécifiques aux norovirus (région de jonction ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3) et adénovirus (Hexon) 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 Viral Stool Panel III contient un **Internal Control RNA** (ICR) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et 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	Control positivo	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 ne 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 Viral Stool Panel III peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants :

Tableau 2 : Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Instrument 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.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler[®] 480II et le 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 (qualité BioScience, 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

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[®] Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'acides nucléiques (par ex., Maxwell[®] RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire les acides nucléiques viraux conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer l'échantillon de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/10. Agiter fortement l'échantillon et le centrifuger à 13 000 x g pendant 1 min. Utiliser un volume adéquat de surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III 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 le Internal Control RNA est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de Internal Control RNA au mélange maître (voir tableau 4).

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 20 µl de **Internal Control RNA** pendant la procédure d'extraction. Le **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 d'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. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans 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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

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'extrait d'ARN 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 de température / Vitesse de montée	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 de température / Vitesse de montée	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

Instruments 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	
	Adénovirus	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	
	Adénovirus	610/670	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adénovirus	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Adénovirus	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	
	Adénovirus	Rouge	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adénovirus	Cy5	

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** pour les norovirus, rotavirus et adénovirus a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 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 * ¹	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

*¹ 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

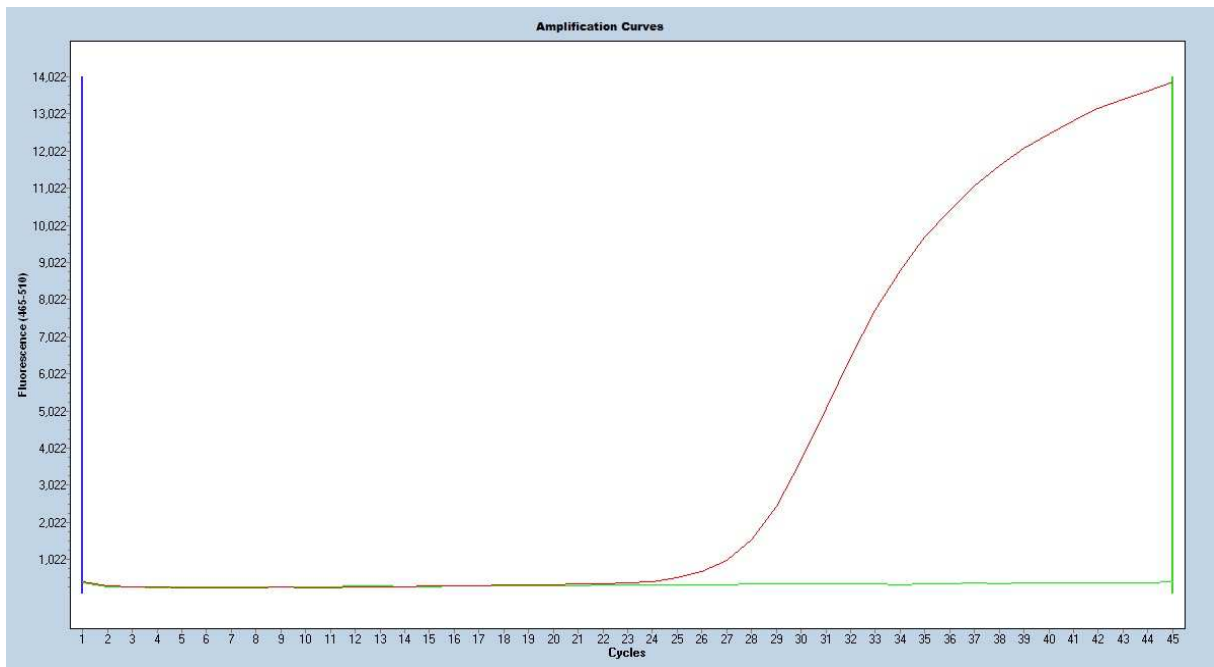


Fig. 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (norovirus) sur le LightCycler® 480II

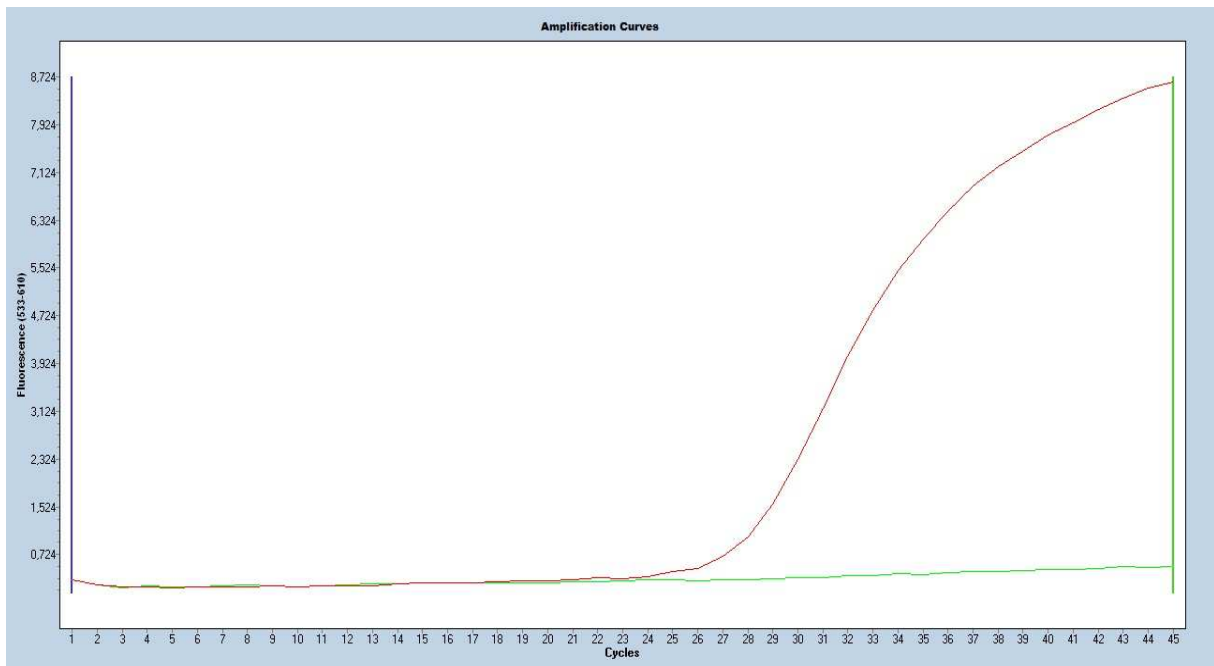


Fig. 2 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (rotavirus) sur le LightCycler® 480II

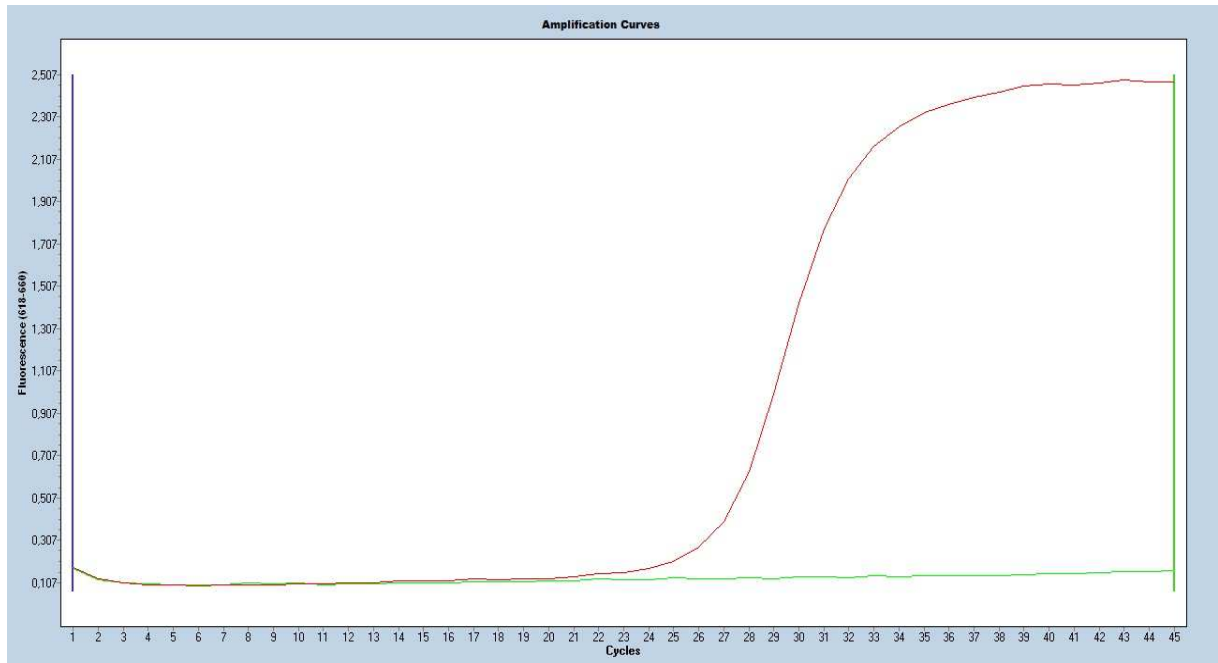


Fig. 3 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (adénovirus) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9 : Interprétation des échantillons

Gènes cibles				
Norovirus	Rotavirus	Adénovirus	ICR	Résultat
positif	négatif	négatif	positif/négatif	Détection de norovirus
négatif	positif	négatif	positif/négatif	Détection de rotavirus
négatif	négatif	positif	positif/négatif	Détection d'adénovirus
positif	positif	négatif	positif/négatif	Détection de norovirus et de rotavirus
positif	négatif	positif	positif/négatif	Détection de norovirus et d'adénovirus
négatif	positif	positif	positif/négatif	Détection de rotavirus et d'adénovirus
positif	positif	positif	positif/négatif	Détection de norovirus, de rotavirus et d'adénovirus
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 être encore 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. Le test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III est uniquement 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 influencer sur les nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III.
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 de gènes cibles (norovirus (région de jonction ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3), adénovirus (Hexon)).
8. Avec le test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III, seuls les sérotypes d'adénovirus 40 et 41, qui provoquent essentiellement une gastro-entérite sont détectés. Les sérotypes 1, 2, 5, 6, 12, 18 et 31 sont rarement liés à une diarrhée aiguë, et ne sont pas détectés par le test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III est ≥ 50 copies d'ARN par réaction.

Les figures 4, 5 et 6 suivantes montrent les séries de dilution pour les astrovirus et rotavirus (10^5 à 10^1 copies d'ARN par μl) et les adénovirus (10^5 à 10^1 copies d'ADN par μl) avec le LightCycler[®] 480II.

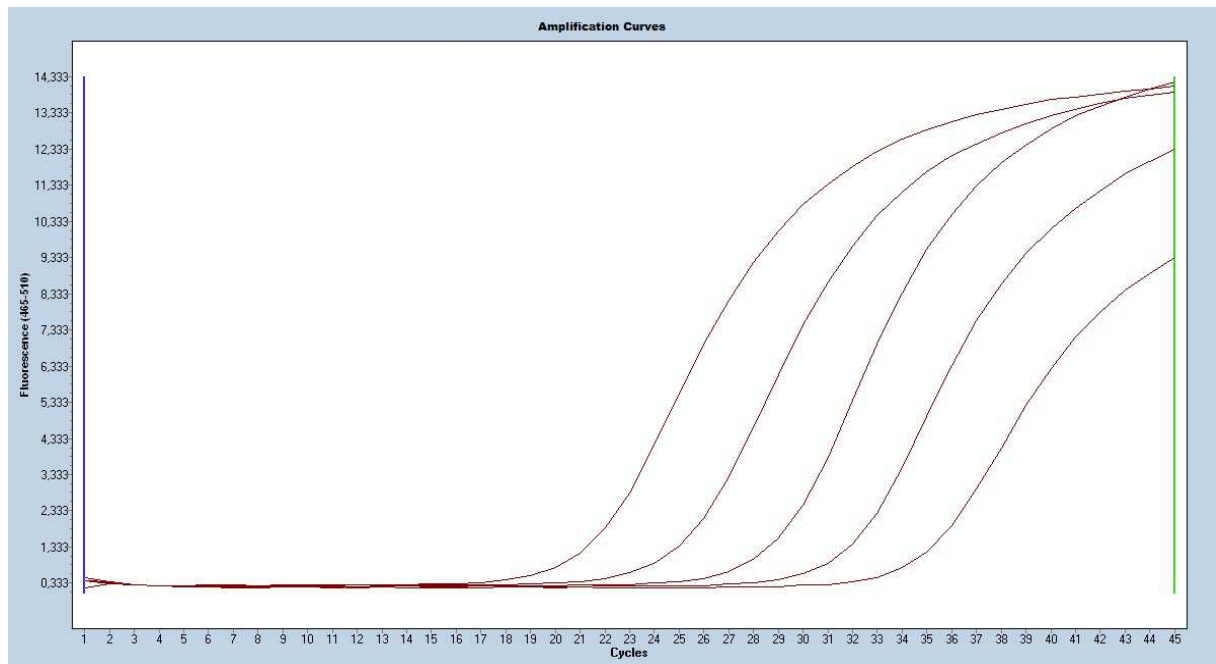


Fig. 4 : Série de dilutions pour les norovirus (10^5 à 10^1 copies d'ARN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

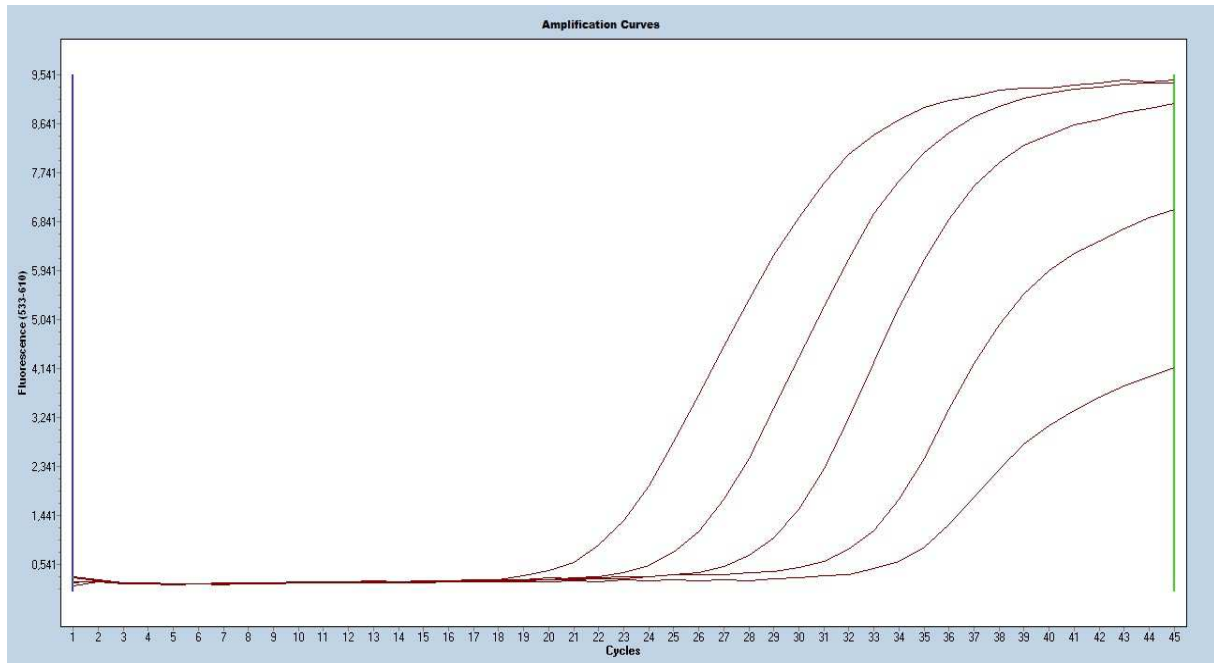


Fig. 5 : Série de dilutions pour les rotavirus (10^5 à 10^1 copies d'ARN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

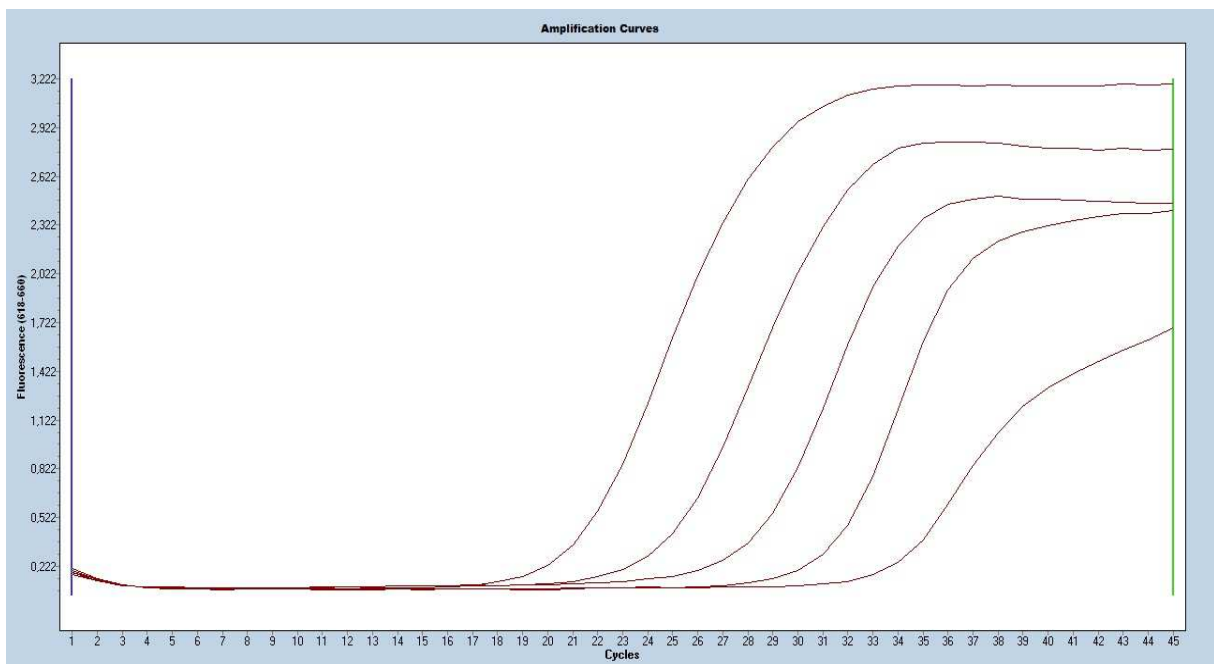


Fig. 6 : Série de dilutions pour les adénovirus (10^5 à 10^1 copies d'ADN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ADN/l'ARN et de la concentration de l'ADN/l'ARN.

13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III est spécifique pour les norovirus, rotavirus et adénovirus. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 10) :

Tableau 10 : Test de la réactivité croisée

Type d'adénovirus : 4	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Type d'adénovirus : 5	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Type d'adénovirus : 7A	-	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Type d'adénovirus : 11	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Type d'adénovirus : 31	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Type d'adénovirus : 37	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Astrovirus type 2	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Astrovirus type 8	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Viral Stool Panel III a été évaluée contre des échantillons de norovirus, rotavirus et adénovirus caractérisés comme étant auparavant positifs (voir tableau 10). Tous les virus testés ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Viral Stool Panel III.

Tableau 11 : Test de la réactivité analytique (nombre d'échantillons testés)










Norovirus					
Génogroupe I					
GGI.1 - Norwalk	+	GGI.3 - Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 - Hesse	+
GGI.2 - Southhampton, Southhampton	+	GGI.4 - Chiba, Malta	+	GGI.7 - Winchester	+
GGI.2 - Southhampton, Whiterose	+	GGI.5 - Musgrove	+	GGI.8 - Boxer	+
Génogroupe II					
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	+	GII.c - Den Haag	+
GGII.4 - Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 - Erfurt	+		
Génogroupe IV					
GGIV.1 - Alphanon	+				
Rotavirus					
Sérogroupe A					
Sérotype G1	+	Sérotype G2	+	Sérotype G3	+
Sérotype G4	+	Sérotype G9	+	Sérotype G12	+
Adénovirus					
Sérotype 40	+	Sérotype 41	+		

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-08-10	Version de la publication

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. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
6. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
7. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical. Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
8. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
9. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8. Aufgerufen am 09.07.2018.
10. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
11. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.

RIDA® GENE Viral Stool Panel III

REF PG1335

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA® GENE Viral Stool Panel III è un test RT-PCR real-time multiplex per la rilevazione qualitativa diretta e la differenziazione di norovirus, rotavirus e adenovirus 40/41 in campioni fecali umani.^{1,2,3}

Il test RIDA® GENE Viral Stool Panel III RT-PCR real-time multiplex deve essere usato come ausilio nella diagnosi gastroenterite causata rispettivamente da norovirus, rotavirus e adenovirus.

2. Sintesi e spiegazione del test

La gastroenterite acuta è una delle principali cause di morbidità e mortalità nel mondo. In particolare nei bambini, i virus enterici sono la prima causa di gastroenterite. Negli Stati Uniti, le infezioni virali causano circa 30,8 milioni di casi di gastroenterite all'anno.⁴ I principali patogeni causa di diarrea sono i norovirus, rotavirus e adenovirus.

I norovirus appartengono alla famiglia *Caliciviridae* e sono virus a filamento singolo di RNA (ssRNA). La gastroenterite causata da norovirus si manifesta con gravi attacchi di nausea, vomito e diarrea. I norovirus sono escreti nelle feci e con il vomito.⁵

Possono essere raggruppati in 7 genogruppi, che attualmente contano 30 genotipi e numerosi cladi. Finora, gli agenti 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 (GIV), con due genotipi.^{6,7} Negli Stati Uniti, si stima che ogni anno oltre 21 milioni di casi di gastroenterite acuta, 70.000 ricoveri e 800 decessi sono provocati da infezioni da norovirus.⁵

I rotavirus sono virus a doppio filamento di RNA (dsRNA) icosaedrici non rivestiti appartenenti alla famiglia *Reoviridae*. I sintomi dell'infezione da rotavirus includono 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.⁸ I rotavirus sono classificati nei sette sierogruppi A – G, dove quelli del sierogruppo A rivestono la maggiore importanza a livello epidemiologico.⁹

Gli adenovirus sono virus a doppio filamento di DNA (dsDNA) icosaedrici non rivestiti, appartenenti alla famiglia *Adenoviridae*. Si distinguono 56 sierotipi di adenovirus umano classificati in sette gruppi (A – G). Gli adenovirus provocano prevalentemente

malattie respiratorie, mentre la gastroenterite è causata principalmente dai sierotipi 40 e 41.^{10,11}

3. Principio del test

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III è un test diagnostico molecolare per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di RNA di norovirus, RNA di rotavirus e DNA di adenovirus 40/41 in campioni di feci umane. La rivelazione 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 viene trascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa. Frammenti di gene specifici di norovirus (regione della giunzione ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3) e adenovirus (esone) vengono quindi amplificati con la PCR real-time. I target amplificati vengono rivelati 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 rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III contiene un **Internal Control RNA** (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 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	Control positivo	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.

- Scongellare 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/scongellamento 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 al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time indicati di seguito:

Tab. 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
Strumento 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

Nota: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo 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 (grado bioscientifico, 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 opera con i campioni.

- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate 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

8. Raccolta e conservazione di campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento del DNA/RNA da campioni di feci umane, utilizzare un kit di estrazione degli acidi nucleici disponibile in commercio (ad es. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione degli acidi nucleici (ad es. Maxwell[®] RSC (Promega)). Estrarre l'acido nucleico virale in base alle istruzioni del produttore. Prima dell'estrazione, si raccomanda di diluire il campione di feci con acqua in rapporto 1:10. Vorticare vigorosamente e centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III contiene un Internal Control RNA che rileva l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia stata 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 di 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 Tab. 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 al campione. 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 Tab. 3 e Tab. 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).

Tab. 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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

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

Tab. 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	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
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

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.

Nota: 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 RNA-Extract nella Master Mix pre-pipettata.

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

Nota: 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 Tab. 5, Tab. 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

Tab. 5: Profilo universale RT-PCR real-time per la serie LightCycler®

Trascrizione inversa	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

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo universale RT-PCR 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

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Nota: 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 rivelazione

Tab. 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Adenovirus	618/660	
Roche LightCycler® 480 z	Norovirus	465/510	È necessario RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	540/580	
	Rotavirus	540/610	
	Adenovirus	610/670	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Controllare che non vi sia il colorante di riferimento
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	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	
	Adenovirus	Rosso	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus	FAM	-
	ICR	VIC	
	Rotavirus	ROX	
	Adenovirus	Cy5	

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, Fig. 1, Fig. 2, Fig.3).

Il **Positive Control** di norovirus, rotavirus e adenovirus ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tab. 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 ^{*1}	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

^{*1} 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

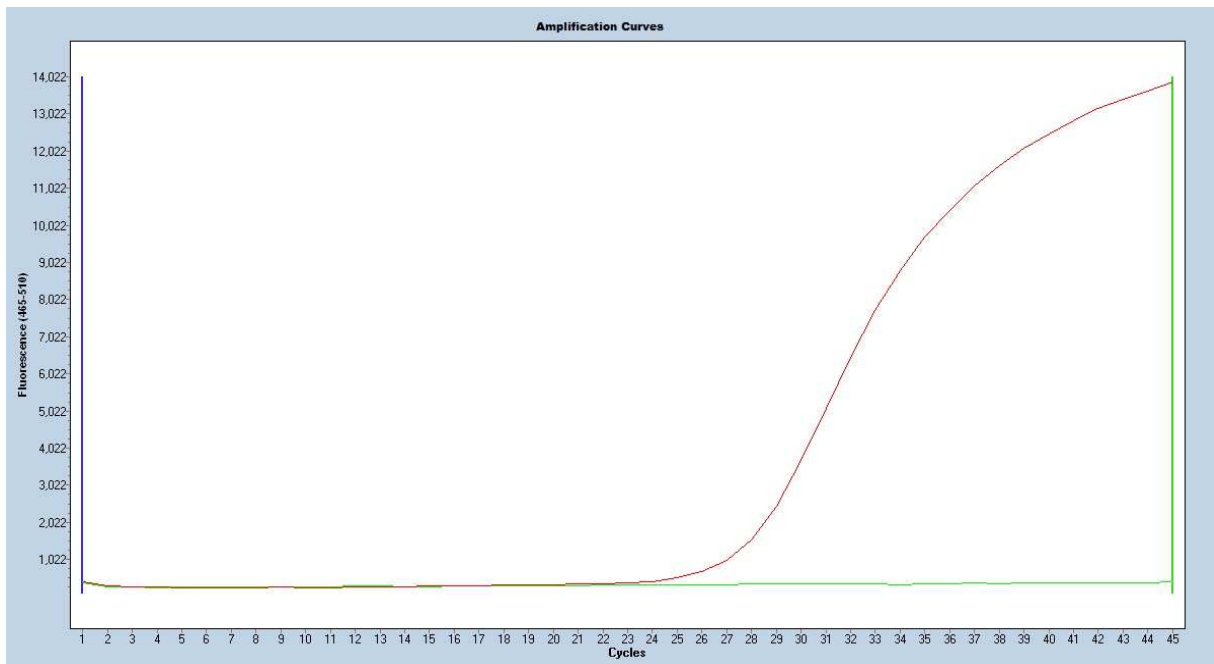


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (norovirus) sul LightCycler® 480II

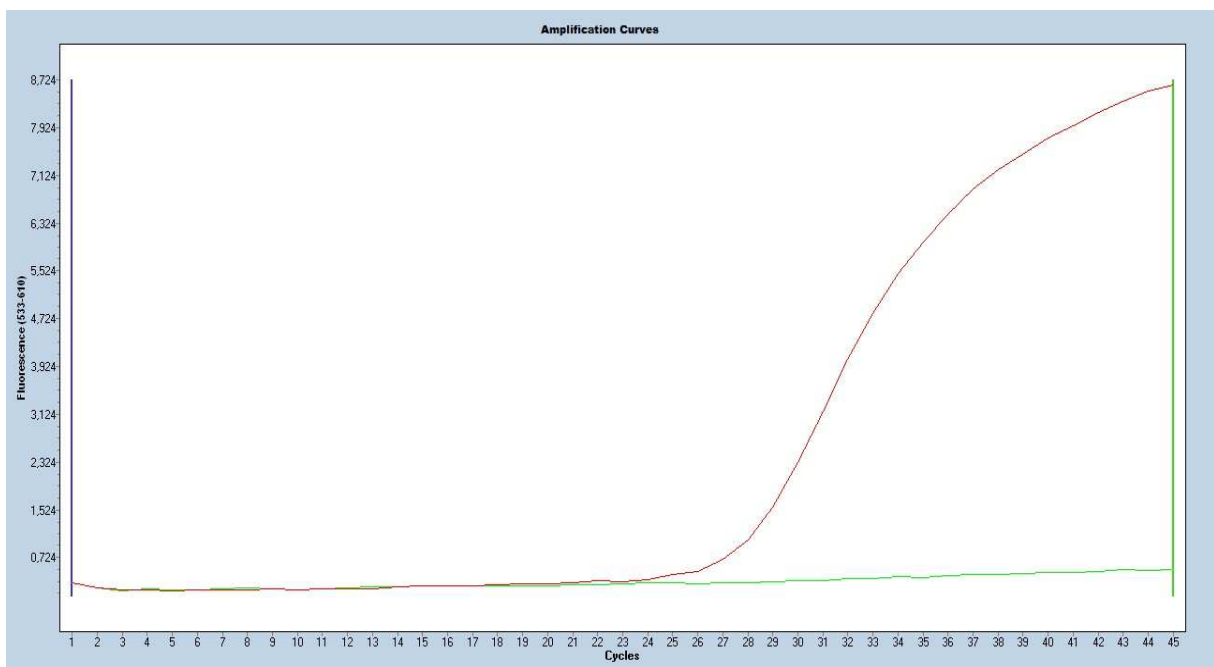


Fig. 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (rotavirus) sul LightCycler® 480II

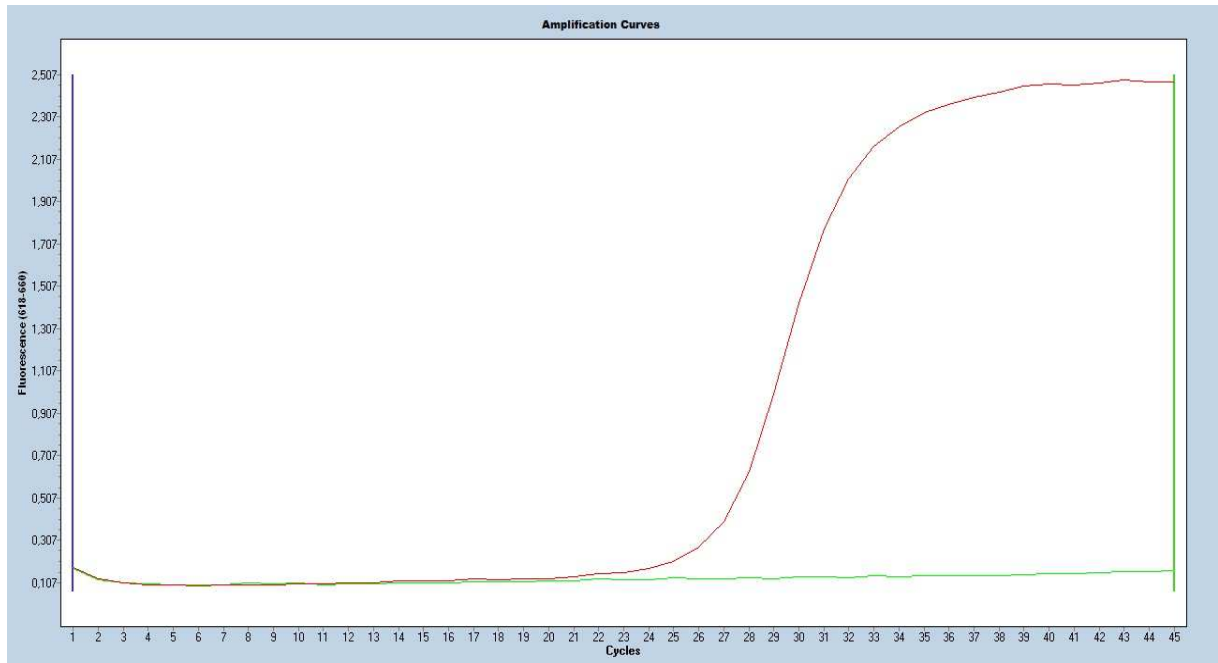


Fig. 3: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (adenovirus) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tab. 9: Interpretazione del campione

Geni target				
Norovirus	Rotavirus	Adenovirus	ICR	Risultato
positivo	negativo	negativo	positivo/negativo	Norovirus rivelato
negativo	positivo	negativo	positivo/negativo	Rotavirus rilevato
negativo	negativo	positivo	positivo/negativo	Adenovirus rilevato
positivo	positivo	negativo	positivo/negativo	Norovirus e rotavirus rilevati
positivo	negativo	positivo	positivo/negativo	Norovirus e adenovirus rilevati
negativo	positivo	positivo	positivo/negativo	Rotavirus e adenovirus rilevati
positivo	positivo	positivo	positivo/negativo	Norovirus, rotavirus e adenovirus rilevati
negativo	negativo	negativo	positivo	Geni target non rivelati
negativo	negativo	negativo	negativo	Non valido

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 rivelazione.

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 rivelazione. La rivelazione 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 rivelazione. La rivelazione 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 rivelazione. 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. Il test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III è convalidato solo per campioni fecali.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti virali 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 le nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, 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 del gene target (norovirus (regione della giunzione ORF1/ORF2), rotavirus (NSP3), adenovirus (esone)).
8. Il test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III individua solamente i sierotipi 40 e 41 dell'adenovirus, ovvero quelli che causano principalmente gastroenterite. I sierotipi 1, 2, 5, 6, 12, 18 e 31 sono raramente associati alla diarrea acuta e pertanto non vengono rilevati da questo test RIDA[®]GENE Viral Stool Panel III.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RT-PCR real-time multiplex RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III di ha un limite di rivelazione ≥ 50 copie di RNA per reazione.

Le figure 4, 5 e 6 mostrano le serie di diluizione di norovirus e rotavirus ($10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) e di adenovirus ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II.

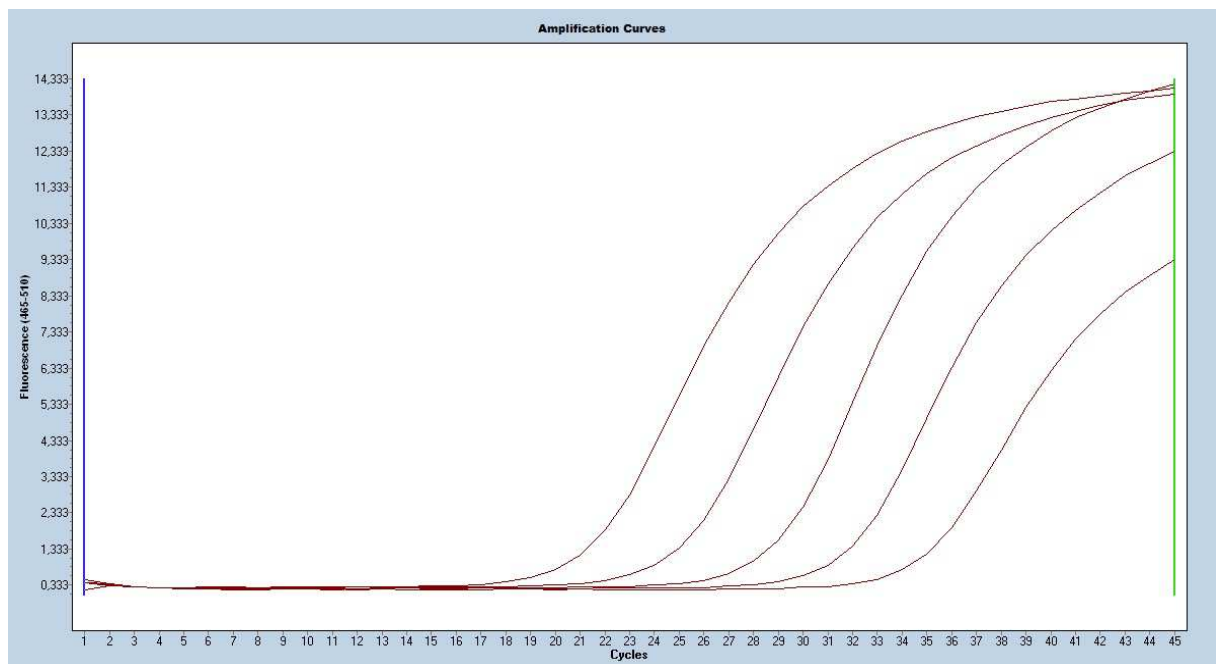


Fig. 4: Serie di diluizione del norovirus ($10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

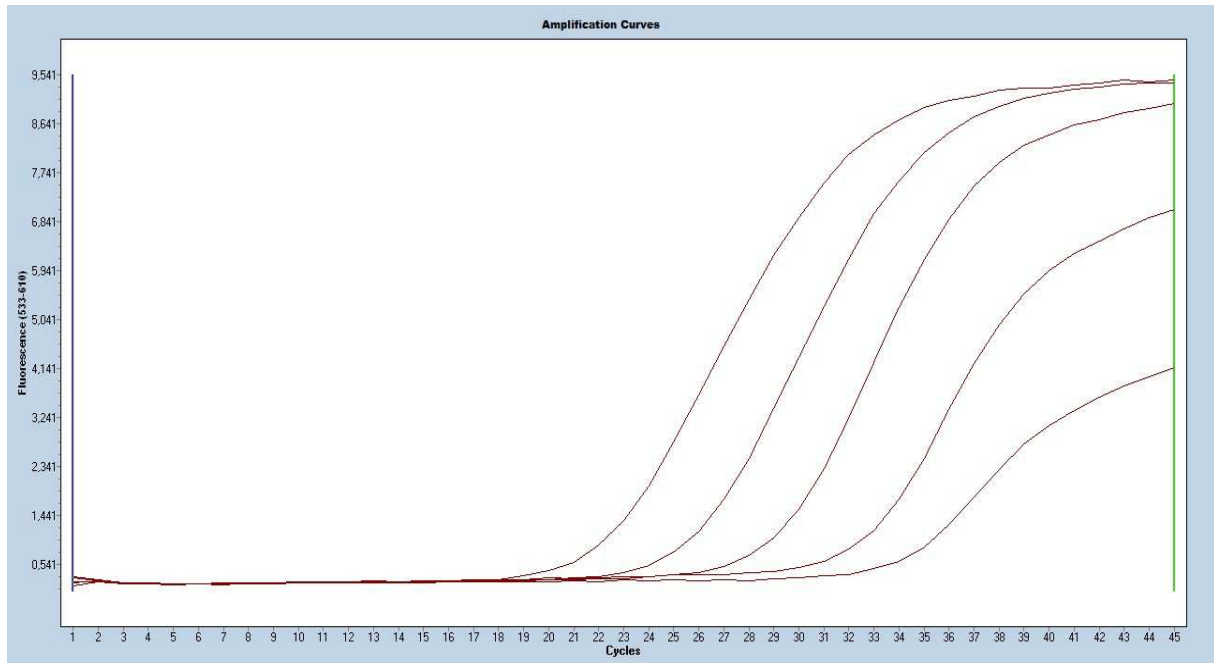


Fig. 5: Serie di diluizione del rotavirus ($10^5 - 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

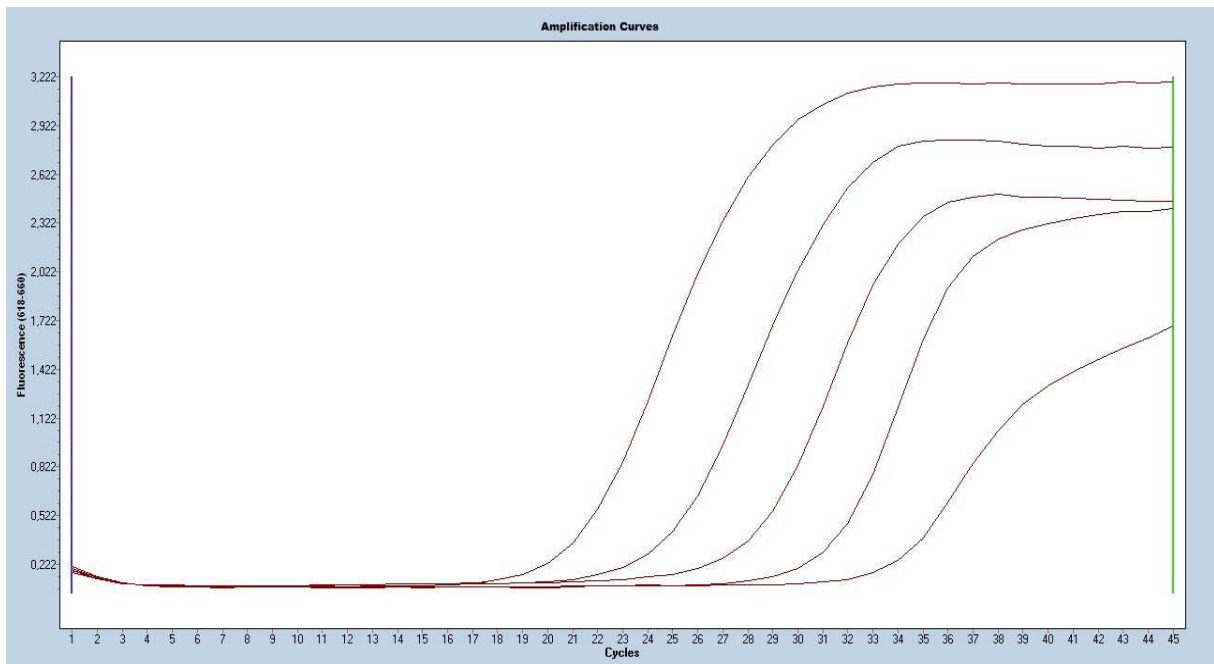


Fig. 6: Serie di diluizione dell'adenovirus ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione del DNA/RNA e dalla concentrazione di DNA/RNA.

13.2 Specificità analitica

La specificità analitica del test PCR real-time multiplex RIDA® GENE Viral Stool Panel III è specifica per norovirus, rotavirus e adenovirus. Non è stata rilevata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 10):

Tab. 10: Test di reattività crociata

Tipo di Adenovirus: 4	-	<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-
Tipo di adenovirus: 5	-	<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Tipo di adenovirus: 7A	-	<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Tipo di adenovirus: 11	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Tipo di adenovirus: 31	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Tipo di adenovirus: 37	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
Astrovirus tipo 2	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
Astrovirus tipo 8	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

13.3 Reattività analitica

La reattività del test PCR real-time multiplex RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III è stata valutata rispetto a più campioni di norovirus, rotavirus e adenovirus risultati precedentemente positivi (vedere Tab. 10). Tutti i virus testati sono stati rivelati con il test PCR multiplex real-time RIDA[®] GENE Viral Stool Panel III.

Tab. 11: Test di reattività analitica (numero di campioni testati)










Norovirus					
Genogruppo I					
GGI.1 - Norwalk	+	GGI.3 - Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 - Hesse	+
GGI.2 - Southhampton, Southhampton	+	GGI.4 - Chiba, Malta	+	GGI.7 - Winchester	+
GGI.2 - Southhampton, Whiterose	+	GGI.5 - Musgrove	+	GGI.8 - Boxer	+
Genogruppo II					
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	+	GII.c - Den Haag	+
GGII.4 - Bristol, Grimsby 2004	+	GGII.10 - Erfurt	+		
Genogruppo IV					
GGIV.1 - Alphatron	+				
Rotavirus					
Sierogruppo A					
Sierotipo G1	+	Sierotipo G2	+	Sierotipo G3	+
Sierotipo G4	+	Sierotipo G9	+	Sierotipo G12	+
Adenovirus					
Sierotipo 40	+	Sierotipo 41	+		

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-08-10	Versione di rilascio

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. Hoehne M, *et al.* Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infectious Diseases*. 2006; 6:69-75.
2. Pang XL, *et al.* Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* 2004, 72: 496–501.
3. Heim A, *et al.* Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 2003, 10: 228-239.
4. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
5. Centers for Disease Control and Prevention. *Norovirus: Overview 2012*.
6. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
7. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical. Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
8. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
9. Robert Koch Institut. Rotaviren-Gastroenteritis. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten. Stand 31.07.2013.
https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8. Aufgerufen am 09.07.2018.
10. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitidendurch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
11. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.