

RIDASCREEN® Rotavirus

REF C0901



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDASCREEN® Rotavirus est un test immunoenzymatique destiné à l'identification qualitative des rotavirus dans des échantillons de selles humaines.

2. Résumé et explication du test

Les rotavirus sont les principaux agents pathogènes mis en cause dans la gastroentérite non bactérienne chez les enfants âgés de 6 mois à 3 ans. Ils peuvent aussi être responsables de maladies chez les enfants plus âgés et les adultes. Chez les groupes à risque (enfants, personnes âgées et patients immunodéprimés), ces infections peuvent être mortelles.

Les infections à rotavirus se produisent principalement pendant les mois d'hiver. Des endémies et épidémies touchant plusieurs milliers de personnes ont également été décrites. Chez les enfants hospitalisés souffrant d'une entérite aiguë, jusqu'à 50 % des échantillons examinés sont positifs pour le rotavirus. Les rotavirus sont transmis par voie oro-fécale ; ils sont excrétés en grande quantité par les intestins, ce qui explique pourquoi les infections nosocomiales par rotavirus sont une grande source d'inquiétude dans les unités de soins aux nouveau-nés et les cliniques pédiatriques, car elles sont difficiles à gérer. Cela signifie qu'une méthode permettant l'identification précoce et fiable des rotavirus est très importante pour prévenir d'autres infections.

Tant que les échantillons de selles et les tissus des biopsies des intestins ne pouvaient pas être examinés par microscopie électronique (qui est actuellement la méthode d'identification standard), il n'était pas possible de détecter les rotavirus. L'identification des cultures cellulaires *in vitro* a aussi permis d'avancer dans ce sens, mais cette méthode est difficile et longue à mettre en place, ce qui explique qu'elle ne soit pas habituellement utilisée pour identifier le rotavirus. Les tests sérologiques ne peuvent que confirmer un diagnostic d'entérite à rotavirus, car les anticorps IgM ne peuvent être décelés que 5 jours après le début de la maladie. Cette méthode ne permet pas d'établir un diagnostic précoce.

Le test RIDASCREEN® Rotavirus est un test immunoenzymatique simple et très sensible qui permet d'identifier précocement et fiablement les antigènes du rotavirus. Il permet aussi de traiter des échantillons de plus grande taille en des laps de temps plus courts.

3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® Rotavirus utilise des anticorps monoclonaux en appliquant une méthode de type sandwich. La surface des puits de la microplaque est revêtue d'un anticorps monoclonal ciblant le 6e gène du virus (VP6). Il s'agit d'un antigène spécifique au groupe et présent chez tous les *rotavirus* responsables de maladies chez l'humain. Une suspension de l'échantillon de selles à examiner ainsi que des

contrôles sont pipetés ensemble avec des anticorps monoclonaux anti-rotavirus biotinylés (conjugué 1) dans le puits de la microplaque, puis sont mis à incuber à température ambiante (20 à 25 °C). Après une étape de lavage, le conjugué polyperoxydase-streptavidine (conjugué 2) est ajouté et de nouveau mis à incuber à température ambiante (20 à 25 °C). En présence de rotavirus dans un échantillon de selles, un complexe en sandwich se forme à partir des anticorps immobilisés, des antigènes de rotavirus et des anticorps conjugués avec le complexe biotine-streptavidine-peroxydase. Le conjugué polyperoxydase-streptavidine non lié est éliminé au cours d'une autre étape de lavage. Dans les échantillons positifs, l'ajout d'un substrat modifie l'enzyme liée dans la solution incolore qui vire au bleu. L'ajout d'un réactif d'arrêt fait virer la couleur du bleu au jaune. L'extinction est proportionnelle à la concentration des rotavirus présents dans l'échantillon.

4. Contenu du paquet

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 déterminations.

Plate	96	Microplaque, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support ; revêtue d'anticorps (souris) monoclonaux anti-rotavirus
Diluent 1	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon, solution de NaCl tamponnée à la protéine ; prêt à l'emploi, de couleur bleue
Wash buffer	100 ml	Tampon de lavage, solution de NaCl tamponnée au phosphate (concentrée 10 fois), contient 0,1 % de thimérosal
Control +	2 ml	Contrôle positif ; culture de rotavirus inactivés ; prêt à l'emploi
Control -	2 ml	Contrôle négatif (tampon de dilution d'échantillon), prêt à l'emploi
Conjugate 1	13 ml	Anticorps monoclonaux (souris) conjugués à la biotine ciblant les <i>rotavirus</i> dans une solution protéique stabilisée, prêts à l'emploi, de couleur rouge
Conjugate 2	13 ml	Conjugué polyperoxydase-streptavidine dans une solution protéique stabilisée, prêt à l'emploi, de couleur orange
Substrate	13 ml	Peroxyde d'hydrogène/TMB, prêt à l'emploi
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt, acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi

Les substances dangereuses sont signalées conformément aux dispositions d'étiquetage obligatoires. Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) à l'adresse www.r-biopharm.com.

5. Instructions de conservation des réactifs

Tous les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Dans ces conditions, ils peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Le tampon de lavage dilué doit être conservé entre 2 et 8 °C pendant 4 semaines maximum. La contamination microbienne doit être évitée. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.

Le sachet en aluminium doit être ouvert à l'aide de ciseaux sans déchirer le joint d'étanchéité. Les barrettes à micropuits qui ne sont pas nécessaires doivent être remises immédiatement dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C. Le substrat incolore doit également être protégé de la lumière directe pour éviter qu'il ne se décompose ou ne bleuisse sous l'effet d'une auto-oxydation. Lorsque le substrat est bleu, il ne doit pas être utilisé.

6. Réactifs requis, mais non fournis

6.1 Réactifs nécessaires

Les réactifs suivants sont nécessaires pour exécuter le test RIDASCREEN® Rotavirus:

Réactifs
Eau distillée ou déionisée

6.2 Matériel de laboratoire nécessaire

Le matériel suivant est nécessaire pour exécuter le test RIDASCREEN® Rotavirus:

Matériel
Tubes à essai
Pipettes à usage unique (réf. : Z0001)
Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.3.)
Micropipette pour volumes de 50 à 100 µl et 1 ml
Éprouvette graduée (1 000 ml)
Chronomètre
Appareil de lavage pour microplaques ou pipettes multicanaux (300 µl)
Photomètre pour microplaques (450 nm et filtre de référence à 620 - 650 nm)
Papier filtre (serviettes de laboratoire)

7. Mesures de précaution

Uniquement 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. Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

Les échantillons ou réactifs ne doivent pas être pipetés à la bouche et tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées doit être évité. Lors de la manipulation des échantillons, porter un équipement de protection individuelle (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons sont manipulés. Pour en savoir plus, consulter la Fiche de données de sécurité (FDS) à l'adresse www.r-biopharm.com.

La trousse comprend un contrôle positif qui contient l'antigène inactivé du rotavirus. Ce contrôle doit être traité comme du matériel potentiellement infectieux et manipulé conformément aux règlements de sécurité nationaux, de la même manière que les échantillons de patients.

Le tampon de lavage contient du thimérosal à 0,1 % en tant que conservateur. Cette substance ne doit pas entrer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses.

Après utilisation, veiller à mettre au rebut tous les réactifs et matériels d'une manière adéquate et responsable. Pour la mise au rebut, respecter les règlements nationaux.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

Les échantillons de selles doivent être obtenus dès que possible, dans les trois jours qui suivent l'apparition des premiers symptômes de diarrhée. Avant utilisation, entreposer le matériel de test entre 2 et 8 °C. S'il n'est pas possible d'effectuer le test en l'espace de trois jours, il est préconisé de conserver le matériel à une température inférieure ou égale à -20 °C. Éviter de congeler et décongeler les échantillons plusieurs fois. Après dilution d'un échantillon de selles dans un tampon de dilution d'échantillon à 1/11, l'échantillon peut être conservé à 2 - 8 °C pour être utilisé dans les trois jours qui suivent (Tableau 1).

Tableau 1: Conservation des échantillons

Échantillon de selles non dilué		Échantillon de selles dilué
2 - 8 °C	≤ - 20 °C	2 - 8 °C
≤ 3 jours	> 3 jours	≤ 3 jours

Les échantillons de selles et les frottis rectaux ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant un milieu de transport et des conservateurs, du sérum animal, des ions métalliques, des agents oxydants ou des détergents, car ces substances peuvent interférer avec le test RIDASCREEN® Rotavirus.

Lorsque des frottis rectaux sont utilisés, il faut veiller à disposer d'une quantité nécessaire de selles pour effectuer le test (env. 100 mg).

La recherche des contacts doit inclure des tests sur des échantillons de selles provenant des personnes ayant été en contact qui ne présentent pas de symptômes cliniques, afin d'identifier des porteurs asymptomatiques.

9. Réalisation du test

9.1 Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque **Plate** doivent être ramenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, les barrettes à micropuits (placées dans des sachets fermés hermétiquement) et les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Une fois utilisées, les barrettes à micropuits ne doivent pas être réutilisées. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient.

Pour éviter toute contamination croisée, les échantillons ne doivent pas entrer en contact direct avec les composants de la trousse.

Le test ne doit pas être réalisé à la lumière directe du soleil. Nous recommandons de couvrir la microplaque ou de placer un film plastique dessus pour éviter toute perte par évaporation.

9.2 Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **Wash buffer** avec 9 volumes d'eau distillée. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent être dissouts au préalable, en les réchauffant dans un bain d'eau à 37 °C.

9.3 Préparation des échantillons

Remplir un tube à essai marqué avec 1 ml de tampon de dilution des échantillons **Diluent 1** de RIDASCREEN®. Aspirer un échantillon de selles liquides (environ 100 µl) au moyen d'une pipette à usage unique (réf. Z0001) jusqu'au-dessus du deuxième repère et ajouter au tampon du tube à essai pour obtenir une suspension. Pour obtenir une suspension avec des selles dures, ajouter une quantité équivalente de selles (environ 50 à 100 mg) prélevée à l'aide d'une spatule ou d'une anse de prélèvement à usage unique.

Homogénéiser la suspension de selles par aspiration, puis éjection avec une pipette à usage unique ou par mélange dans un agitateur-mélangeur vortex. Laisser la

suspension reposer pendant une courte période (10 minutes) pour laisser aux particules grossières de selles le temps de se déposer ; le liquide clair surnageant la suspension de selles peut être directement utilisé pour le test. Si la procédure de test est effectuée dans un automate ELISA, ce liquide surnageant doit être dépourvu de particules. Dans ce cas, une centrifugation à 2 500 G pendant 5 minutes est recommandée.

Remarque: Des échantillons de selles dilués dans le Diluent | 1 peuvent être soumis à tous les tests RIDASCREEN® ELISA qui utilisent le Diluent | 1.

9.4 Première incubation

Après avoir rempli une quantité suffisante de puits dans le support, ajouter 100 µl du contrôle positif Control | +, du contrôle négatif Control | - ou de la suspension de l'échantillon de selles dans les puits. Ajouter ensuite 100 µl de l'anticorps conjugué à la biotine Conjugate | 1 et mélanger (en tapotant légèrement le bord de la plaque), puis incuber pendant 60 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

9.5 Lavage

Un lavage soigneux est important afin d'obtenir des résultats corrects ; il convient donc de suivre les instructions fournies à la lettre. La substance incubée dans les puits doit être déversée dans un conteneur de déchets et mise au rebut conformément aux réglementations locales. Retourner ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Laver ensuite la plaque cinq fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage Wash buffer. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant après chaque lavage sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé.

En cas d'utilisation d'un laveur de microplaques ou d'un système ELISA entièrement automatisé, veiller à ce que l'appareil soit correctement réglé. Demander, au besoin, au fabricant de vous en fournir les réglages. Les appareils fournis par R-Biopharm sont déjà programmés avec des réglages et des protocoles de travail validés. Pour éviter d'obstruer les aiguilles de lavage, il convient de n'utiliser que des suspensions de selles dépourvues de particules (voir paragraphe 9.3, Préparation des échantillons). S'assurer également que tout le liquide est aspiré à chaque étape de lavage.

9.6 Seconde incubation

À l'aide d'une pipette, ajouter 100 µl de conjugué polyperoxydase-streptavidine Conjugate | 2 dans les puits, puis incuber pendant 30 minutes à température ambiante (20 à 25 °C).

9.7 Lavage

Laver en suivant les instructions de la rubrique 9.5.

9.8 Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **Substrate** dans tous les puits. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (20 à 25 °C), dans le noir, pendant 15 minutes. Remplir ensuite tous les puits avec 50 µl de réactif d'arrêt **Stop** afin d'arrêter la réaction. Après un mélange soigneux en tapotant légèrement le côté de la plaque, mesurer l'extinction à 450 nm (en variante : à 450/620 nm). Le réglage de la valeur nulle doit s'effectuer dans l'air, et donc sans la microplaque.

Remarque: Des échantillons de patients fortement positifs peuvent entraîner des précipités noirâtres du substrat.

10. Contrôle qualité – signes d'instabilité ou de détérioration des réactifs

À des fins de contrôle qualité, chaque fois qu'un test est effectué, il est nécessaire d'utiliser des contrôles positif et négatif, pour vérifier la stabilité des réactifs et la réalisation correcte du test. Le test s'est déroulé correctement lorsque la valeur d'extinction (DO) du contrôle négatif à 450 nm est inférieure à 0,2 (inférieure à 0,160 à 450/620 nm) et lorsque la valeur mesurée du contrôle positif est supérieure à 0,8 à 450 nm ou à 450/620 nm. Une valeur supérieure à 0,2 (0,160) pour le contrôle négatif pourrait indiquer que le lavage n'a pas été suffisant. Tout écart par rapport aux valeurs requises, par exemple la présence de turbidité ou d'une coloration bleue du substrat incolore avant le remplissage des puits, pourrait indiquer une dénaturation des réactifs.

En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (par ex. étalonnage)
- Procédure de test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

11.1. Calcul de la valeur seuil

Pour déterminer la valeur seuil, on ajoute 0,15 unité d'extinction à l'extinction mesurée du contrôle négatif.

$$\text{Valeur seuil} = \text{valeur d'extinction du contrôle négatif} + 0,15$$

11.2. Résultats du test

Un échantillon est estimé comme étant positif lorsque sa valeur d'extinction est supérieure de plus de 10 % à la valeur seuil calculée.

Un échantillon est estimé comme étant limite si sa valeur d'extinction se situe dans une plage allant de -10 % à +10 % de la valeur seuil. Si un nouvel examen utilisant un nouvel échantillon de selles obtient une valeur comprise dans cette même plage d'ombre, l'échantillon est considéré comme étant négatif.

Des échantillons ayant des valeurs d'extinction inférieures à -10 % de la valeur seuil calculée doivent être considérés comme étant négatifs.

12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Rotavirus permet d'identifier les antigènes des rotavirus dans les échantillons de selles. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre le niveau d'une valeur d'extinction déterminée et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement aux signes et symptômes cliniques.

Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux.

Un résultat négatif n'exclut pas une éventuelle infection à *rotavirus*. Un tel résultat peut être causé par l'élimination temporaire du virus ou par une quantité trop faible d'antigène dans l'échantillon. Si l'anamnèse est en faveur d'une suspicion d'infection par *rotavirus*, un autre prélèvement de selles doit être examiné.

Un résultat limite peut être causé par une répartition non homogène des virus dans l'échantillon des selles. Dans un tel cas, l'examen doit être répété avec une deuxième suspension provenant du même échantillon ou il convient de demander un autre prélèvement de selles à examiner.

13. Performances

13.1 Qualité du test

Le test RIDASCREEN® Rotavirus a été validé par comparaison avec trois tests ELISA de détection des rotavirus disponibles dans le commerce. L'ensemble d'échantillons utilisé comprenait des échantillons frais prélevés le jour même dans un laboratoire habituel et des échantillons préparés et congelés au préalable à -20 °C pour une utilisation dans l'étude de comparaison. Une suspension homogène de référence a été testée par chacun des tests ELISA conformément aux instructions du fabricant. Un échantillon était considéré comme étant positif ou négatif si deux des trois tests de référence obtenaient des résultats semblables. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2: Corrélation entre le test RIDASCREEN® Rotavirus ELISA et trois autres tests ELISA disponibles dans le commerce

RIDASCREEN® Rotavirus	Test ELISA de la concurrence		Total
	+	-	
+	22	1*	23
-	1*	112	113
Total	23	113	136

* Les deux échantillons ont obtenu des résultats négatifs pour le test de détection du rotavirus par PCR.

Sensibilité : 95,7 % Spécificité : 99,1 %

13.2 Réactivité croisée

Différents micro-organismes pathogènes du tractus intestinal ont été examinés avec le test RIDASCREEN® Rotavirus ELISA et n'ont pas présenté de réactivité croisée. Ces études ont été réalisées avec des suspensions de bactéries dont les concentrations étaient de 10^6 à 10^9 organismes par ml. Les surnageants et toxines de la culture de virus ainsi que les échantillons de selles sont également indiqués. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3: Réactivité croisée avec des micro-organismes pathogènes

Organisme	Origine	Source	[DO 450 nm] valeur moyenne
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Culture	DSM 2403	0,078
<i>Aeromonas hydrophila anaerogenes</i>	Culture	DSM 30020	0,068
<i>Aeromonas hydrophila hydrophila</i>	Culture	DSM 30016	0,078
<i>Citrobacter sp.</i>	Culture	DSM 30047	0,055
<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	DSM 30039	0,090
<i>Enterobacter cloacae</i>	Culture	DSM 30054	0,072
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	DSM 2570	0,066
<i>Enterococcus faecium</i>	Culture	DSM 20477	0,095
<i>E. coli</i>	Culture	LMU Munich	0,069
<i>E. coli</i>	Culture	LMU Munich	0,082
<i>E. coli</i>	Culture	LMU Munich	0,083
<i>E. hermannii</i>	Culture	DSM 4560	0,054
<i>Lactococcus lactis</i>	Culture	DSM 20481	0,073
<i>Listeria innocua</i>	Culture	DSM 20649	0,078
<i>Proteus mirabilis</i>	Culture	DSM 788	0,053
<i>Proteus mirabilis</i>	Culture	DSM 4479	0,065
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	DSM 30119	0,053
<i>Providencia stuartii</i>	Culture	DSM 6676	0,080
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	DSM 939	0,065
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Culture	DSM 4358	0,061
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Culture	DSM 50124	0,082
<i>Pseudomonas putida</i>	Culture	DSM 291	0,058
<i>Salmonella agona</i>	Culture	LMU Munich	0,097
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Culture	DSM 4224	0,088
<i>Salmonella infantis</i>	Culture	LMU Munich	0,059
<i>Salmonella ohio</i>	Culture	LMU Munich	0,061
<i>Salmonella typhimurium</i>	Culture	DSM 554	0,052
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	DSM 4487	0,050
<i>Shigella flexneri</i>	Culture	DSM 4782	0,063
<i>Shigella sonnei</i>	Culture	DSM 5570	0,048
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	DSM 20372	0,063
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Culture	DSM 2134	0,078
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Culture	DSM 20662	0,079

<i>Streptococcus uberis</i>	Culture	DSM 20569	0,072
<i>E. coli</i> (O157:H-)	Culture	LMU Munich	0,097
<i>E. coli</i> (O116:H21)	Culture	LMU Munich	0,074
<i>E. coli</i> (O111:H-)	Culture	LMU Munich	0,084
<i>E. coli</i> (O22:H8)	Culture	LMU Munich	0,095
<i>E. coli</i> (O26:H11)	Culture	LMU Munich	0,086
<i>Candida albicans</i>	Culture	ATCC 10231	0,082
<i>Salmonella enteritidis</i>	Culture	DSM 9898	0,065
<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	DSM 4688	0,054
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	DSM 4689	0,073
<i>Campylobacter fetus</i>	Culture	DSM 5361	0,064
<i>Helicobacter pylori</i>	Culture	DSM 4867	0,053
<i>Morganella morganii</i>	Culture	DSM 6675	0,053
<i>Astrovirus</i>	Surnageant de culture	Micromun	0,055
<i>Astrovirus</i>	Selles	TU Dresden	0,080
<i>Adenovirus</i>	Surnageant de culture	Micromun	0,065
<i>Adenovirus</i>	Selles	TU Dresden	0,061
<i>H. pylori</i>	Inactivé <i>H. pylori</i> lysat	Contrôle de la trousse RIDASCREEN® <i>H. pylori</i> FemtoLab	0,082
<i>C. perfringens</i> 50 µg/ml	Toxoïde	Contrôle de la trousse <i>C. perfringens</i> entérotoxine A	0,058
<i>Shigatoxin STX1</i>	Toxoïde	Toxin Technology	0,064
<i>Shigatoxin STX2</i>	Toxoïde	Toxin Technology	0,073
<i>C. sordellii</i>	Culture	tgcBiomics	0,060
<i>C. difficile</i>	Culture	VPI 1640	0,060
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Culture	Waterborne Inc.	0,052
<i>Campylobacter</i>	Selles	Laboratoire habituel	0,042
<i>Giardia lamblia</i>	Selles	TI Berlin	0,037
<i>Entamoeba histolytica</i>	Selles	TI Berlin	0,049
<i>Salmonella enteritidis</i>	Selles	Laboratoire habituel	0,066
<i>Sapovirus</i>	Selles	TU Dresden	0,062

13.3 Précision

La reproductibilité du test RIDASCREEN® Rotavirus ELISA a été étudiée avec six références qui couvrent l'ensemble de la plage de mesure des valeurs faiblement à fortement positives.

Afin de déterminer la reproductibilité intra-test, 40 répétitions de ces références ont été mesurées. La trousse 1 a été testée avec la référence standard 1 (RS 1) et les trousse 2 et 3 avec la référence standard 2 (RS 2). Les valeurs moyennes et les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour les trois lots.

Pour ce qui est de la reproductibilité inter-tests, les références de dix jours de travail différents ont été mesurées en double, avec deux passages par jour. Les mesures ont été effectuées en trois lots par trois techniciens.

La reproductibilité inter-lots a été déterminée pour deux lots (lots 2 et 3). Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4: Reproductibilité et précision du test RIDASCREEN® Rotavirus ELISA

Référence Valeur moyenne / CV(%)		Intra-test			Inter-tests			Inter- lots
		Lot de la trousse 1 (RC 1)	Lot de la trousse 2 (RC 2)	Lot de la trousse 3 (RC 2)	Lot de la trousse 1 (RC 1)	Lot de la trousse 2 (RC 2)	Lot de la trousse 3 (RC 2)	Lot de la trousse 2 et 3
1	VM	2,279	2,116	2,300	2,206	1,902	2,035	1,968
	CV (%)	4,82 %	9,38 %	6,86 %	11,78 %	20,30 %	18,33 %	19,42 %
2	VM	1,318	1,311	1,535	1,642	1,273	1,389	1,331
	CV (%)	8,87 %	10,67 %	5,00 %	14,82 %	25,42 %	21,61 %	23,70 %
3	VM	1,265	1,184	1,517	1,483	1,117	1,219	1,168
	CV (%)	9,82 %	13,36 %	5,25 %	15,00 %	22,68 %	21,43 %	22,01 %
4	VM	0,837	0,660	0,853	1,116	0,710	0,781	0,745
	CV (%)	10,26 %	15,12 %	4,53 %	17,26 %	25,81 %	24,37 %	25,36 %
5	VM	0,658	0,544	0,670	0,738	0,548	0,607	0,578
	CV (%)	9,94 %	14,99 %	4,85 %	17,78 %	25,43 %	26,14 %	26,21 %
6	VM	0,373	0,298	0,509	0,532	0,386	0,435	0,411
	CV (%)	9,85 %	15,38 %	7,43 %	17,94 %	28,90 %	27,73 %	28,87 %

13.4 Sensibilité analytique

Le seuil de détection du test RIDASCREEN® Rotavirus ELISA a été déterminé avec une dilution en série d'un échantillon de selles quantifié par microscopie immunoélectronique (MIE). Les mesures ont été prises en triple, d'après un titre de virus de $10,6 \times 10^7$ particules/ml. Le seuil de détection a été défini à $6,63 \times 10^3$ particules virales/ml de l'échantillon de selles. Les résultats de la série de titrage sont indiqués dans le tableau 5. À noter que la valeur positive de DO dans le test ELISA est le résultat de la présence de particules virales intactes, mais aussi de fragments du virus qui ne sont pas décomptés dans la MIE.

Tableau 5: Détermination de la sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Rotavirus ELISA

MIE	RIDASCREEN® Rotavirus	
	Valeur moyenne [OD 450]	Résultats
5,3 x 10 ⁶	4,036	Positif
5,3 x 10 ⁵	4,043	Positif
2,65 x 10 ⁵	4,051	Positif
1,325 x 10 ⁵	4,060	Positif
0,663 x 10 ⁵	3,140	Positif
5,3 x 10 ⁴	2,022	Positif
2,65 x 10 ⁴	0,788	Positif
1,325 x 10 ⁴	0,451	Positif
0,663 x 10 ⁴	0,240	Positif
0,332 x 10 ⁴	0,124	Négatif
0,165 x 10 ⁴	0,049	Négatif

13.5 Substances interférentes

Les substances mentionnées ci-dessous n'ont pas présenté d'effet sur les résultats du test lorsqu'elles ont été mélangées dans les échantillons de selles positifs et négatifs pour le *rotavirus* dans les concentrations indiquées :










Mucines	5,0 % p/p	Diclofénac	0,00263 % v/p
Sang humain	5,0 % v/p	Cyclamate	5,0 % v/p
Sulfate de baryum	5,0 % p/p	Combinaison d'acide stéarique et d'acide palmitique	40 % p/p (mélange 1:1)
Lopéramide	5,0 % p/p		
Pepto-bismol	5,0 % v/p	Métronidazole 0,5 % solution	5,0 % v/p

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2017-04-20	Version précédente
2019-07-08	Révision générale 4. Contenu du paquet 8. Prélèvement et conservation des échantillons 9.2 Préparation du tampon de lavage 9.5 Lavage

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

Plate	Plaque de microtitrage
Diluent 1	Tampon de dilution d'échantillon 1
Wash buffer	Tampon de lavage
Control +	Contrôle positif
Control -	Contrôle négatif
Conjugate 1	Conjugué 1
Conjugate 2	Conjugué 2
Substrate	Substrate
Stop	Réactif stop

16. Bibliographie

1. Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L., and Brown, F.: Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology Supplement 2. Springer Verlag, New York, pp 140-144 (1992)
2. Estes, M.K. and Cohen, J.: Rotavirus Gene Structure and Function. Microbiological Reviews 53: 410-419 (1989)
3. Bishop, R.F., Davidson, G. P., Holmes, I.H. and Ruck, B.J.: Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. Lancet 1, 149-151 (1974)
4. Kapikian, A.Z., Yolken, R.H., Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Kalica, A.R., Chanock, R. M. and Kim, H.W.: Gastroenteritis viruses. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections, 5th Ed., (1980) Lennette, E.H., Schmidt, N.J., Eds. Amer. Pub. Health Assoc., Washington, D.C., 927-996
5. Flewett, T.H. and Woode, G.N.: The Rotavirus. Arch. Virology 57, 1-23 (1978)
6. Steinhoff, M.C: Rotavirus: The first five years. J. Ped. 96, 611-622 (1980)
7. Blacklow, N.R. and Cukor, G.: Viral Gastroenteritis. New England Journal of Medicine 304, 397-406 (1981)
8. Wenman, W.M., Hinde, D., Feltham, S. and Gurwith, M.: Rotavirus Infection in Adults. Results of a Prospective Study. New England Journal of Medicine 301, 303-306 (1979)
9. Cubitt, W.D.: Rotavirus Infection: An Unexpected Hazard in Units Caring for the Elderly. Geriatric Medicine Today 1, 33-38 (1982)
10. Marrie, T.J., Spencer, H.S., Faulkner, R.S., Ethier, J. and Young, C.H.: Rotavirus Infection in a Geriatric Population. Arch. Intern. Med. 142, 313-316 (1982)

11. Coulson, B.S. and Holmes, I.H.: An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Rotavirus in Faeces of Neonates. *J. Virol. Methods* 8, 165-179 (1984)
12. Hung, T., Wang, Ch., Fang, Z., Chou, Z., Chang, X., Liang, X., Chen, G., Yao, H., Chao, T., Ye, W., Den, S. and Chang, W.: Waterborne outbreak of Rotavirus Diarrhoea in Adults in China caused by a Novel Rotavirus. *Lancet*, 1139-1142 (1984)
13. Cukor, G., Perron, D.M., Hudson, R. and Blacklow, N.R.: Detection of Rotavirus in Human Stools by Using Monoclonal Antibody. *J. Clin. Microol.* 19, 888-892 (1984)
14. Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Perron, D.M., Cukor, G., Krause, P.J., Hyams, J.S., Bar-rett, H.J. and Ogra, P.L.: Enzyme immunoassay with Monoclonal Antibody Enzyme Im-munoassay for Detection of Rotavirus in Stool Specimens. *J. Infect. Dis.* 152, 830-832 (1985)
15. Yolken, R.H.: Enzyme Immunoassays for the Detection of Infectious Antigens in Body Flu-ids: Current Limitations and Future Prospects. *Rev. Infect. Dis.* 4, 35-68 (1982)
16. Eing, B.R. *et al*: Evaluation of Two Enzyme Immunoassays for Detection of Human *Rota-viruses* in *Fecal Specimens*. *J. Clin. Microbiology* 12/2001 p. 4532-4534