

## RIDA® GENE Viral Stool Panel I

**REF** PG1315



## 1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE Viral Stool Panel I est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation des Norovirus, Rotavirus, Adénovirus 40/41 et Astrovirus dans les échantillons de selles humaines<sup>1,2,3,4</sup>. Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Viral Stool Panel I est destiné à faciliter le diagnostic de la gastro-entérite provoquée par les Norovirus, Rotavirus, Adénovirus 40/41 et Astrovirus 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 année<sup>5</sup>. Les agents pathogènes les plus importants à l'origine de diarrhées sont les Norovirus, les Rotavirus, les Adénovirus et les Astrovirus.

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.

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<sup>7,8</sup>. 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-Unis<sup>6</sup>.

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 estimations<sup>9</sup>. Les Rotavirus sont classés en sept sérogroupes (A à G), ceux du séro groupe A étant ceux qui sont les plus importants du point de vue épidémiologique<sup>10</sup>.

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<sup>11,12</sup>.

Les Astrovirus sont des virus à ARN simple brin (ARNsb) et appartiennent à la famille des *Astroviridae*. Une gastro-entérite provoquée par Astrovirus se manifeste

principalement par de la diarrhée, qui peut être aussi accompagnée de vomissements et de fièvre. Dans les pays développés, l'incidence de l'Astrovirus est de 2 à 9 %, la maladie touchant principalement les enfants de moins de deux ans<sup>13</sup>. Il existe actuellement 8 sérotypes décrits, les sérotypes 1 à 5 étant les plus pertinents. L'infection est transmise par des aliments contaminés, par l'eau et par voie oro-fécale<sup>15</sup>.

### 3. Principe du test

Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Viral Stool Panel I est un test de PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe et la différenciation de l'ARN des Norovirus, l'ARN des Rotavirus, l'ADN des Adénovirus 40/41 et l'ARN des Astrovirus dans des échantillons de selles humaines. La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape, c'est-à-dire que la transcription inverse (RT) 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 gènes spécifiques aux Norovirus (région de jonction ORF1/ORF2), Rotavirus (NSP3), Adénovirus 40/41 (hexon) et Astrovirus (CAP, protéine de capsid) sont ensuite amplifiés.

Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur.

L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA<sup>®</sup>GENE Viral Stool Panel I 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	Positive Control	1x	200 µl	bleu

#### 5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).
- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test 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 I 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
Agilent Technologies	Mx3005P

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

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- 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 sans poudre
- 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](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Prélèvement et conservation des échantillons

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

Pour isoler l'ARN/l'ADN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'acides nucléiques (par ex., RIDA® 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 I 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
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

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

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

## 9.2 Préparation du mélange pour la PCR

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

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

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

**Échantillon:** Ajouter 5 µl d'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® 480II

<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

<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

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 480II	Adénovirus	440/488	<b>RIDA® GENE</b> Le kit de compensation de couleur IV (PG0004) est nécessaire
	Norovirus	465/510	
	ICR	533/580	
	Rotavirus	533/610	
	Astrovirus	618/660	
Agilent Techn. Mx3005P	Adénovirus	ATTO	<b>Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé</b> <b>REMARQUE: Les « paramètres de gain du jeu de filtres » pour ATTO doivent être réglés sur 8</b>
	Norovirus	FAM	
	ICR	HEX	
	Rotavirus	ROX	
	Astrovirus	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 Adénovirus 40/41, Norovirus, Rotavirus et Astrovirus a une concentration de  $10^3$  copies/ $\mu$ l. Chaque série de PCR utilise au total  $5 \times 10^3$  copies de contrôle positif.

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

Échantillon	Résultat du test	Ct ICR	Ct cible
Positive control	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

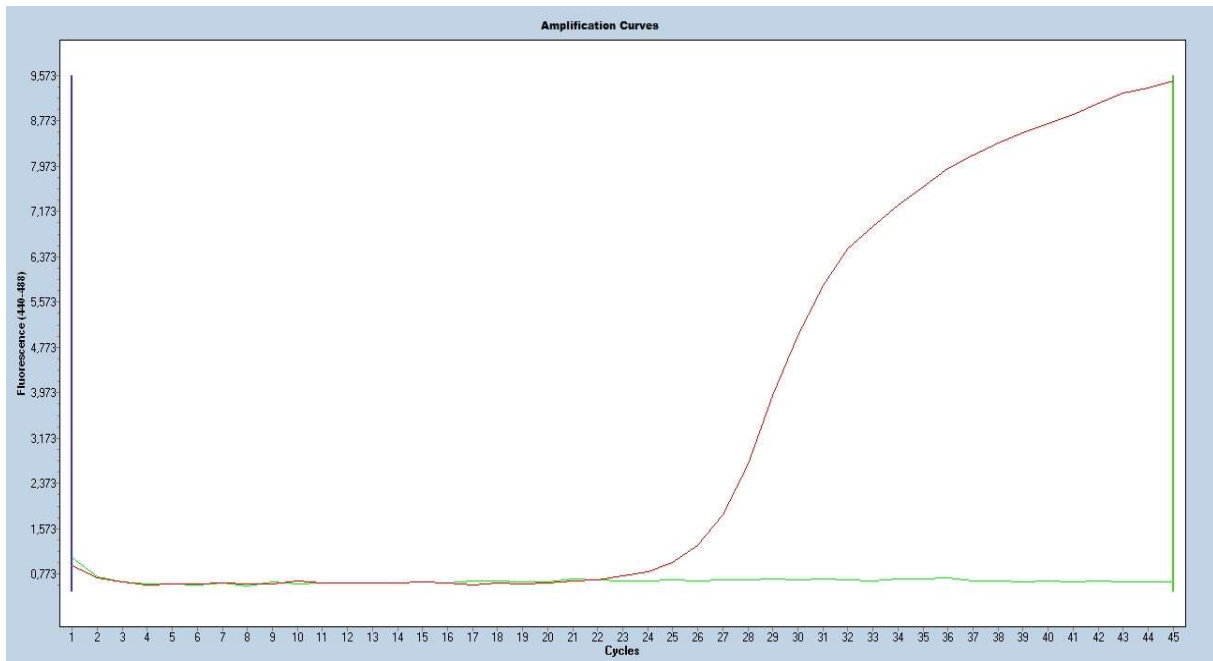
\*1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

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.

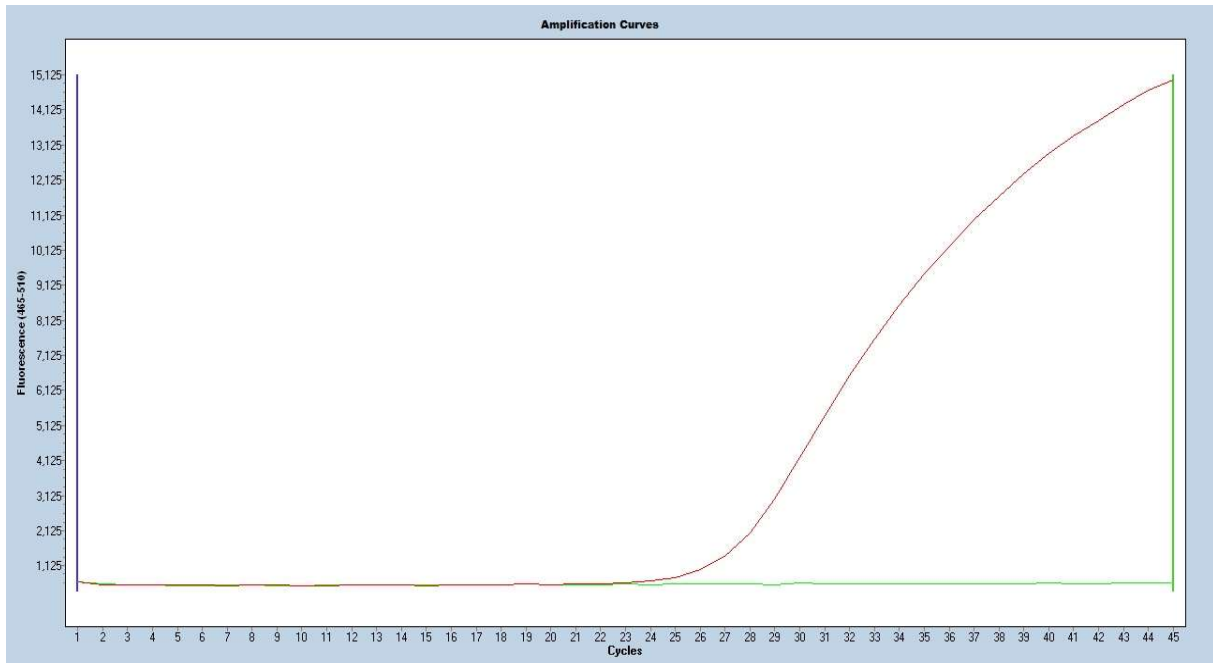
Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

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

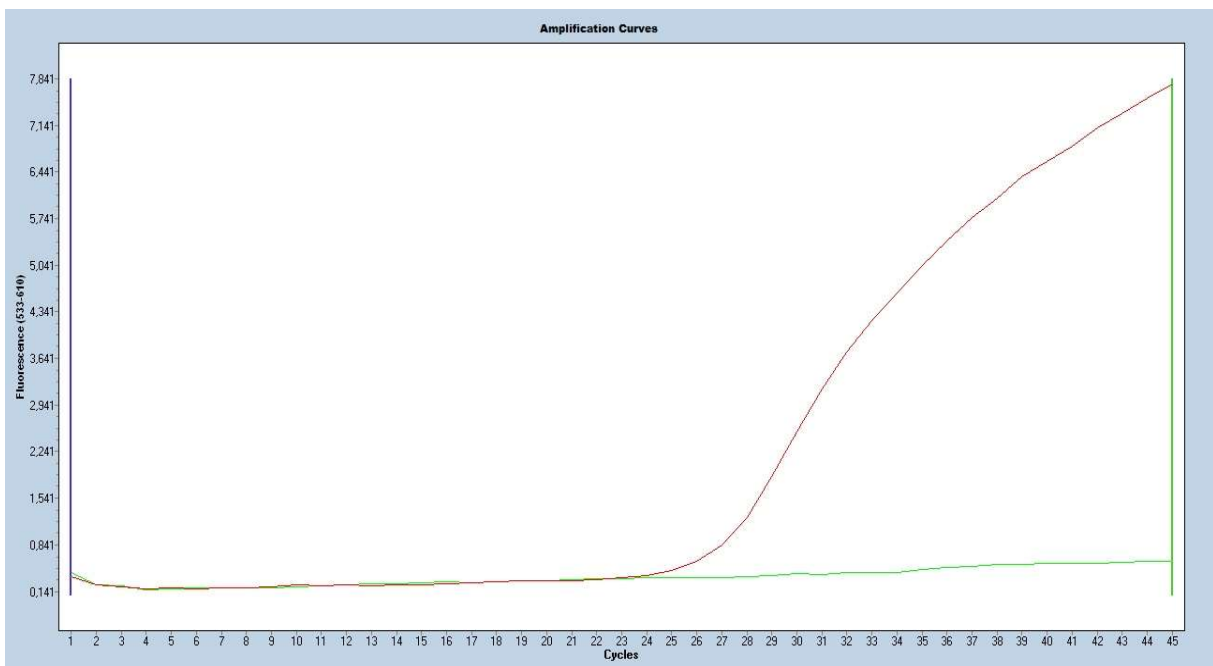
- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test



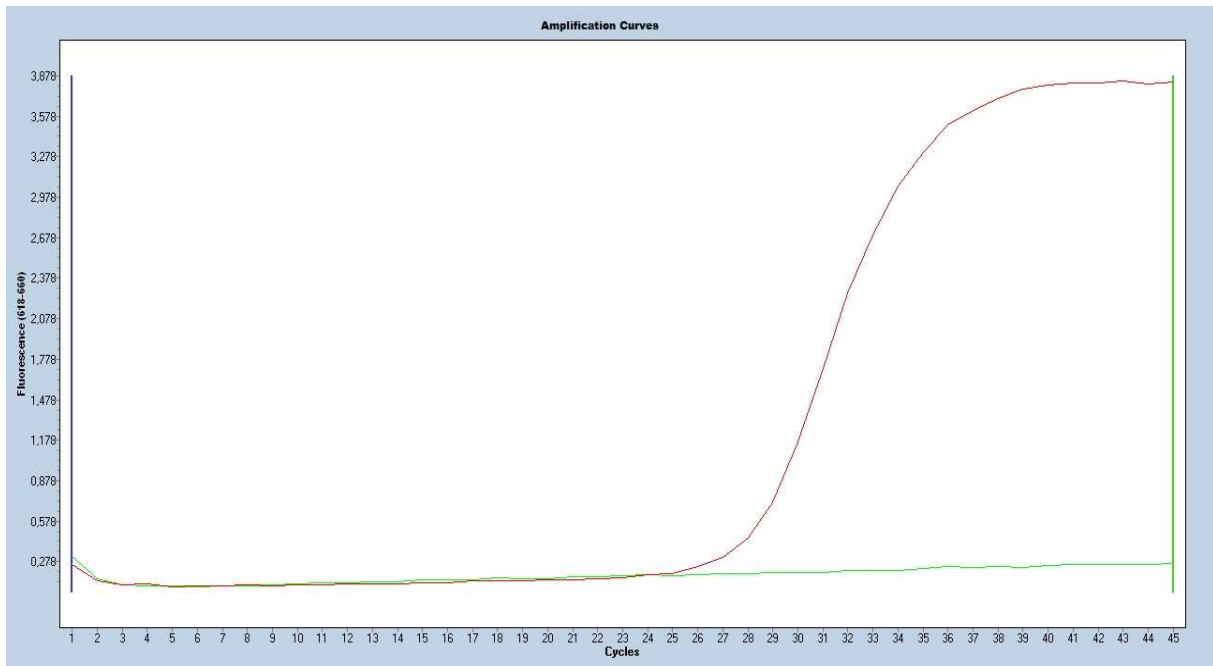
**Fig. 1:** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (Adénovirus) sur le LightCycler® 480II



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



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



**Fig. 4:** Exécution correcte des contrôles positif et négatif (Astrovirus) sur le LightCycler® 480II

## 11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

**Tableau 9:** Interprétation des échantillons

Gènes cibles				ICR	Résultat
Adénovirus	Norovirus	Rotavirus	Astrovirus		
<b>positif</b>	négatif	négatif	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus</b>
négatif	<b>positif</b>	négatif	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection de Norovirus</b>
négatif	négatif	<b>positif</b>	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection de Rotavirus</b>
négatif	négatif	négatif	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Astrovirus</b>
<b>positif</b>	<b>positif</b>	négatif	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus et de Norovirus</b>
<b>positif</b>	négatif	<b>positif</b>	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus et de Rotavirus</b>
<b>positif</b>	négatif	négatif	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus et d'Astrovirus</b>
négatif	<b>positif</b>	<b>positif</b>	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection de Norovirus et de Rotavirus</b>
négatif	<b>positif</b>	négatif	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection de Norovirus et d'Astrovirus</b>
négatif	négatif	<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection de Rotavirus et d'Astrovirus</b>
<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif</b>	négatif	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus et de Rotavirus</b>
<b>positif</b>	<b>positif</b>	négatif	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus, de Norovirus et d'Astrovirus</b>
<b>positif</b>	négatif	<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus, de Rotavirus et d'Astrovirus</b>
négatif	<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection de Norovirus, de Rotavirus et d'Astrovirus</b>
<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif</b>	<b>positif/négatif</b>	<b>Détection d'Adénovirus, de Norovirus, de Rotavirus et d'Astrovirus</b>
négatif	négatif	négatif	négatif	<b>positif</b>	<b>Gènes cibles non détectés</b>
négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	<b>Non valide</b>

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 I 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 I.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence des gènes cibles (Adénovirus 40/41 [hexon], Norovirus [région de jonction ORF1/ORF2], Rotavirus [NSP3] et Astrovirus [CAP ; protéine de capside]).
8. Le génogroupe IV de Norovirus, qui infecte très rarement les humains, sera aussi détecté par le test RIDA®GENE Viral Stool Panel I.
9. Avec le test RIDA®GENE Viral Stool Panel I, 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 donc pas détectés par ce test de PCR en temps réel.

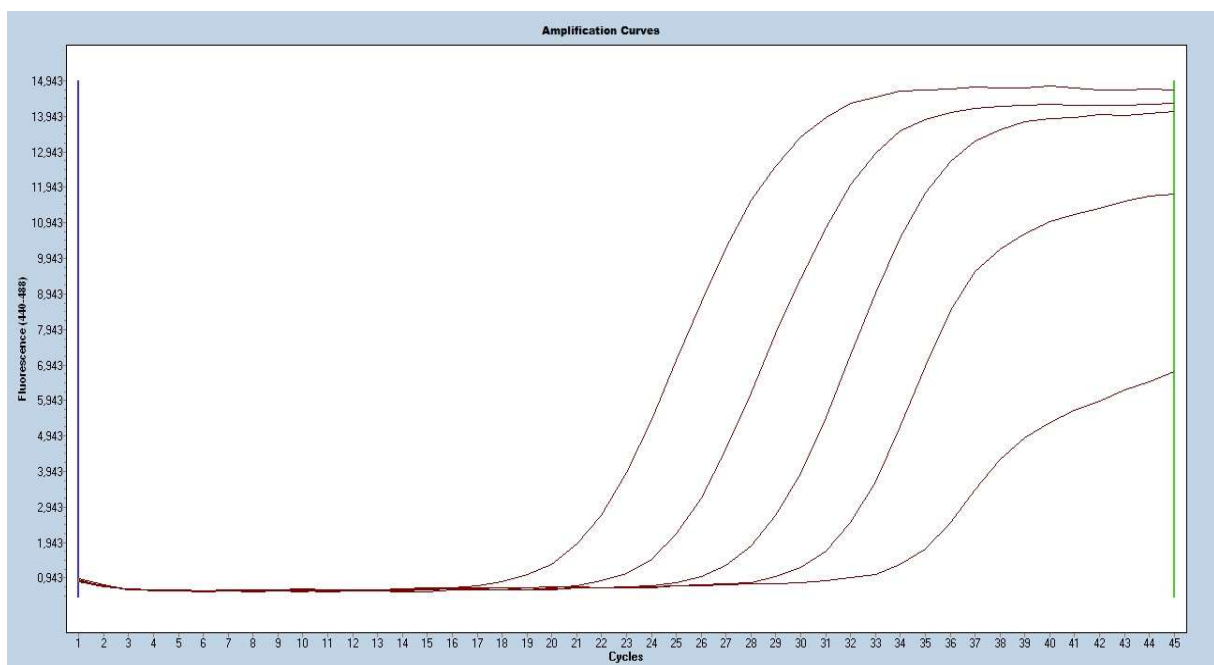
10. La mucine peut présenter des caractéristiques de perturbation à une concentration de 2,5 % (v/v) ou plus.

### 13. Performances

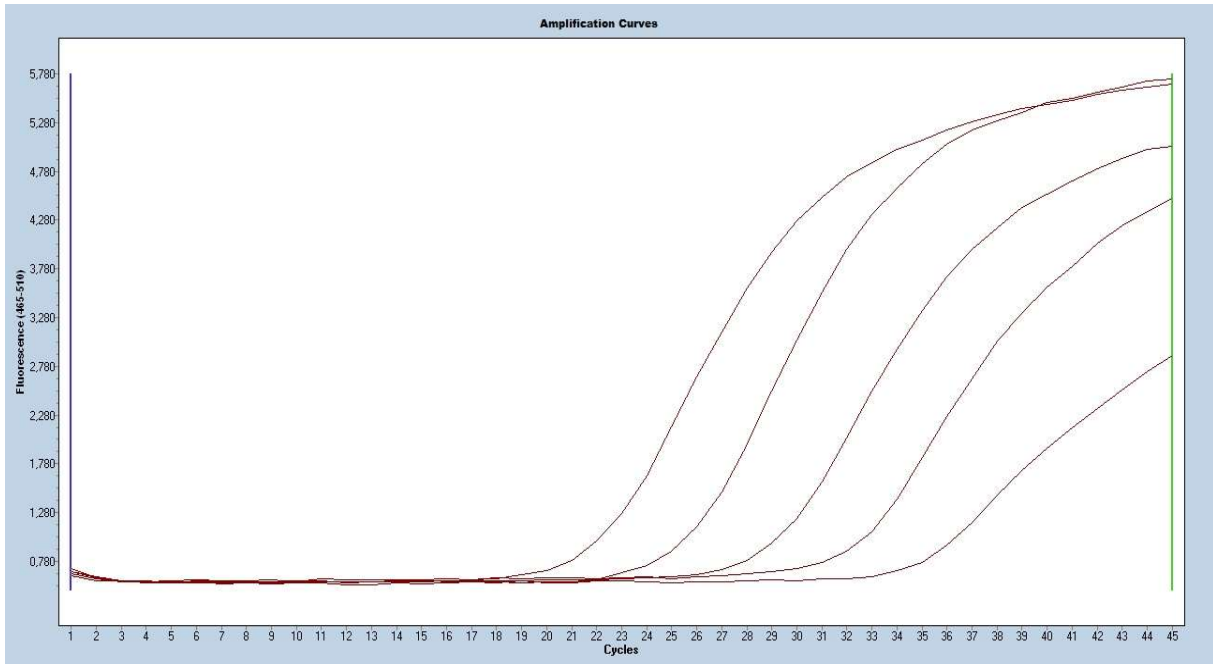
#### 13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Viral Stool Panel I est  $\geq 50$  copies d'ARN par réaction.

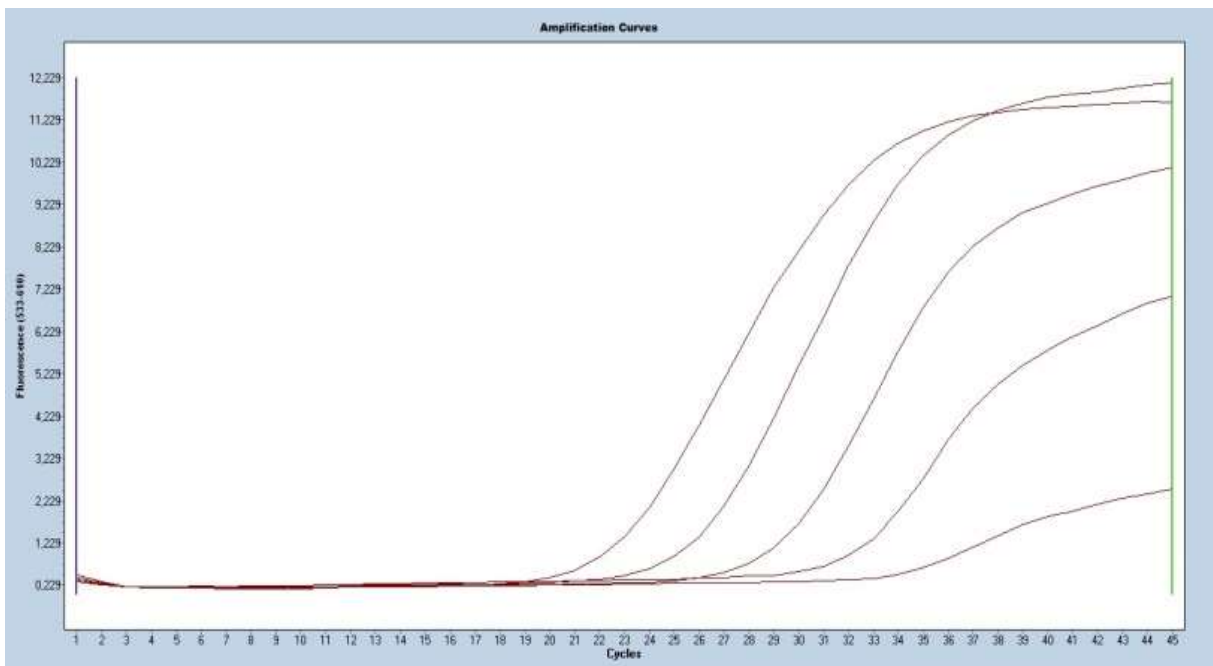
Les figures 5, 6, 7 et 8 suivantes montrent les séries de dilution pour les Adénovirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ADN par  $\mu\text{l}$ ), les Norovirus, Rotavirus et Astrovirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II.



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

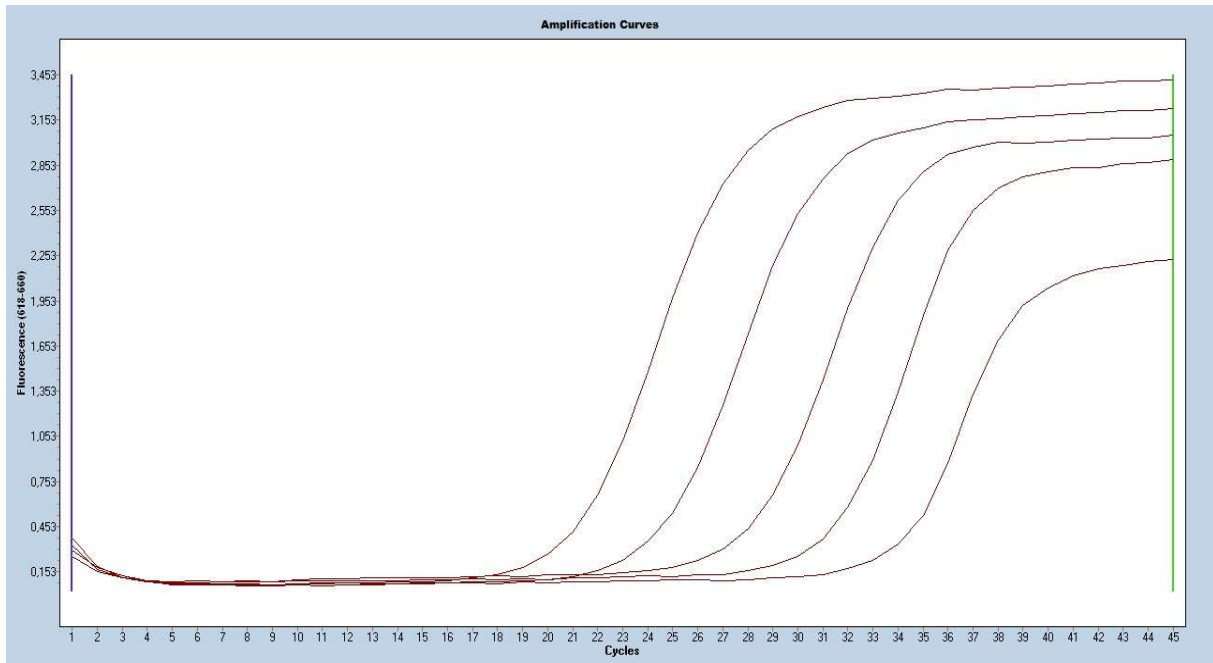


**Fig. 6:** Série de dilutions pour les Norovirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II



**Fig.7:** Série de dilutions pour les Rotavirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II





**Fig. 8:** Série de dilutions pour les Astrovirus ( $10^5$  à  $10^1$  copies d'ARN par  $\mu\text{l}$ ) avec le LightCycler® 480II

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

## 13.2 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Viral Stool Panel I est spécifique aux Adénovirus, Norovirus (génogroupes I et II), Rotavirus et Astrovirus. 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 fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Type d'Adénovirus: 5	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Type d'Adénovirus: 7A	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Type d'Adénovirus: 11	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
Type d'Adénovirus: 31	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
Type d'Adénovirus: 37	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-				

### 13.3 Réactivité analytique

La réactivité du test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Viral Stool Panel I a été évaluée avec les Adénovirus, Norovirus, Rotavirus et Astrovirus (voir tableau 11). Tous les Adénovirus, Rotavirus, sérogroupes d'Astrovirus et génogroupes de Norovirus testés ont été détectés par le test de PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Viral Stool Panel I ou par alignement de séquences (\*).

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










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

## 14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-06-14	Version précédente
2021-01-27	Révision générale 10. Contrôle qualité (faute de frappe) 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

## 15. Signification des symboles

### Symboles généraux

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

### Symboles spécifiques au test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

## 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. Kapoor A, *et al.* Multiple novel Astrovirus species in human stool. *Journal of general Virology* 2009, 90: 2965-2972.
5. Mead PS, *et al.* *EID* 1999, 5: 607-625.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
7. Parra GI, *et al.* Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017, 13(1): e1006136.
8. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal Clinical Microbiology* 2015, 53(2):373-81.
9. Parashar UD, *et al.* Rotavirus and Severe Childhood Diarrhea. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12: 304-306.
10. 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](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Rotaviren.html;jsessionid=D381EC22661EBE5C847628E9368E3401.2_cid381#doc2374564bodyText8). Aufgerufen am 09.07.2018.
11. Robert Koch Institut. Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitiden durch Adenoviren. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte 2010.
12. Robinson CM, *et al.* Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2011, 11: 1208-1217.
13. Guix S, *et al.* Human astrovirus diagnosis and typing: current and future Prospects. *Letters of Applied Microbiology* 2005, 41:103-105.
14. Wilhelmi I, *et al.* Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection* 2003, 9: 247-262.
15. Guix S, *et al.* Human Astroviruses. *Clinical Microbiology Reviews* 2014, 27:1048-1074.