

RIDASCREEN® Norovirus

3rd Generation

Réf. : C1401



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Allemagne

Téléphone : +49 (0) 61 51 - 81 02-0 / Fax : +49 (0) 61 51 - 81 02-20



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. Le test RIDASCREEN® Norovirus 3^e génération est un test immunoenzymatique destiné à l'identification qualitative des génotypes I et II du norovirus dans des échantillons de selles humaines.

2. Résumé et explication du test

Les *norovirus* sont responsables de nombreux cas de gastroentérite dans le monde entier, avec un nombre estimé de 23 millions de cas par an aux États-Unis (1, 2). Ils sont souvent impliqués dans les flambées infectieuses dans des institutions et des communautés comme les établissements de soins, hôpitaux, garderies d'enfants et prisons ou les navires de croisière (3, 4, 5). Même si les flambées d'infections à norovirus peuvent représenter une lourde charge pour la santé publique, elles sont le plus souvent signalées comme des cas d'infection bactérienne (6).

La gastroentérite provoquée par le norovirus se caractérise par de fortes nausées, des vomissements puissants et une diarrhée sévère. On observe une période d'incubation de 6 à 48 heures, après laquelle les symptômes peuvent persister pendant 12 à 60 heures. La dose infectieuse de seulement 100 particules virales est extrêmement faible, ce qui permet au virus de se propager de manière très efficace d'une personne à l'autre. Vu que le virus est libéré aussi bien dans les vomissements que dans les selles, la formation de gouttelettes d'aérosol portant le virus fait que la transmission par voie aérienne est tout aussi importante que la transmission oro-fécale. Ceci est flagrant lors de la propagation très rapide de l'infection dans les environnements communautaires sociaux.

À quelques exceptions près, le virus est excrété pendant environ deux semaines, ce qui ajoute un risque supplémentaire de contagion. Une réinfection par le norovirus est possible aussi du fait que la variabilité prononcée de cet organisme ne permet pas l'acquisition d'une immunité totale. Les méthodes habituelles de diagnostic par analyse des échantillons de selles se limitent à la microscopie électronique ou l'identification moléculaire du génome par réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Étant donné que ces méthodes sont relativement lourdes et nécessitent aussi une expertise et un matériel technique de laboratoire spécifiques, il est nécessaire de trouver un test de dépistage plus simple et plus rapide. Ce test ELISA, qui en est déjà à sa troisième génération, répond bien à ce défi. Le test RIDASCREEN® Norovirus ELISA avec des anticorps monoclonaux permet une identification très spécifique et sensible des deux génotypes du norovirus.

3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® Norovirus 3^e génération utilise des anticorps monoclonaux spécifiques en appliquant une méthode de type sandwich. La surface des puits de la microplaque est revêtue d'anticorps spécifiques aux antigènes de plusieurs génotypes différents.

Une suspension de l'échantillon de selles à examiner ainsi que les contrôles sont pipetés ensemble avec des anticorps monoclonaux anti-norovirus 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 norovirus dans un échantillon de selles, un complexe en sandwich se forme à partir des anticorps immobilisés, des antigènes du norovirus 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 norovirus présents dans l'échantillon.

4. Réactifs fournis

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 monoclonaux anti-norovirus
Diluent 1	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon, solution de NaCl tamponnée à la protéine, prêt à l'emploi, de couleur bleue
Wash	100 ml	Tampon de lavage, solution de NaCl tamponnée au phosphate (concentrée 10 fois), contient 0.1% de thimérosal
Control +	2 ml	Contrôle positif (protéine de capsid de <i>norovirus</i> inactivée) ; prêt à l'emploi
Control -	2 ml	Contrôle négatif (tampon de dilution d'échantillon), prêt à l'emploi
Conjugate 1	13 ml	Anticorps anti-norovirus conjugués à la biotine dans une solution protéique stabilisée, prêts à l'emploi, de couleur bleue
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

5. Les réactifs et leur stockage

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 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. Autres réactifs et matériels nécessaires

6.1. Réactifs fournis

- Eau distillée ou désionisée

6.2. Équipement

- Tubes à essai
- Pipettes à usage unique (réf. : Z0001)
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.3.)
- Micropipettes 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)
- Conteneur de déchets avec une solution d'hypochlorite à 0,5 %

7. Précautions à prendre par l'utilisateur

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.

Le contrôle positif de la trousse contient la protéine de capsid de norovirus inactivée. Ce contrôle doit être traité comme du matériel potentiellement infectieux et manipulé conformément aux règlements de sécurité nationaux, de la même manière que l'échantillon du patient.

Le tampon de lavage contient du thimérosol 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. Évitez 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 4 °C pour être utilisé dans les sept jours qui suivent.

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® Norovirus 3^e génération.

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 échantillons de selles provenant des personnes ayant été en contact qui ne présentent pas de symptômes cliniques, afin d'identifier des porteurs asymptomatiques.

9. Procédures de 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** 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 **Control | +** ou du **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. 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. Deuxième 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 de réactif périmé

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® Norovirus 3^e génération identifie les antigènes du norovirus dans les échantillons de selles, détectant les deux génotypes (I et II) qui sont responsables de maladies chez l'humain. Tous les génotypes et sous-types correspondants n'ont pas été testés, mais quasiment tous les génotypes responsables de flambées de gastroentérite jusqu'à ce jour peuvent être testés, tant que la charge virale dans l'échantillon n'est pas inférieure au seuil de détection du test ELISA au moment du prélèvement de l'échantillon. 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 en rapport au tableau clinique.** Il est possible que des personnes asymptomatiques libèrent le virus ; elles peuvent être détectées avec ce test ELISA (recherche des contacts). La charge virale disponible est toujours décisive.

Un résultat **positif** n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux. La littérature relative à des doubles et multiples infections par des agents pathogènes potentiels de la gastroentérite est abondante. Ces cas peuvent être diagnostiqués à l'aide de méthodes différentielles. Dans de nombreux cas, les signes et symptômes cliniques sont plus prononcés que ceux des infections à origine unique.

Un résultat **négatif** n'exclut pas une éventuelle infection à norovirus. Il peut s'expliquer par l'excrétion intermittente du virus, le prélèvement de l'échantillon à un moment inadapté (voir paragraphe 8 « Prélèvement et conservation des échantillons »), une charge virale très faible ou une mauvaise manipulation de l'échantillon. Si l'anamnèse est en faveur d'une suspicion d'infection par norovirus, 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, une charge virale limite à l'origine pour le test ELISA ou un lavage insuffisant des micropuits ; il peut aussi indiquer une régression de l'infection. 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.

Le test RIDASCREEN® Norovirus ELISA n'est pas encore validé pour les échantillons de méconium ; la prudence est donc de mise lors de l'interprétation de ces tests. Plusieurs produits de soins des nouveau-nés comme les crèmes, huiles et onguents susceptibles d'être transférés vers l'échantillon de selles au moment de son prélèvement ont été utilisés pour doper des échantillons de selles négatifs pour le norovirus ; les résultats de l'analyse n'ont pas été pour autant affectés. Les échantillons de selles positifs pour le norovirus n'ont pas été non plus négativement affectés lorsqu'ils ont été testés avec les produits de marque.

13. Performances

13.1. Étude de comparaison clinique

Une étude de validation avec le test RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3^e génération impliquait 60 échantillons qui avaient été examinés par réaction en chaîne de la polymérase après transcription inverse (RT-PCR) dans le cadre d'un examen diagnostique de routine pendant l'hiver 2004/2005 à l'Institut de virologie de l'Université technologique de Dresden, où ils ont été par la suite congelés (-20 °C) et stockés. Un autre groupe de 123 échantillons obtenus pendant la saison hivernale (janvier à mai) 2006 a aussi été soumis à la RT-PCR, puis congelé et stocké pour une utilisation ultérieure. Les résultats de ces deux groupes d'échantillons sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Corrélation entre le test RIDASCREEN® Norovirus ELISA 3^e génération et la RT-PCR

		Groupe RIDASCREEN® SH 2004/5		Groupe RIDASCREEN® SH 2006	
		+	-	+	-
RT-PCR	+	28	2	55	15
	-	0	30	0	53

Sensibilité :	93,3 %	78,6 %
Spécificité :	100,0 %	100,0 %
Valeur prédictive positive (VPP) :	100,0 %	100,0 %
Valeur prédictive négative (VPN) :	93,8 %	77,9 %
Précision :	96,7 %	87,8 %

13.2. Réactivité croisée

Divers micro-organismes pathogènes du tractus intestinal ont été examinés avec le test RIDASCREEN® Norovirus ELISA. Ces études ont été réalisées avec des suspensions de bactéries ou de virus non diluées dont les concentrations étaient de 10⁶ à 10⁹ organismes par ml. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Réactivité croisée avec des micro-organismes pathogènes

Organisme	Origine	[DO 450/620]
Adénovirus	Surnageant de culture cellulaire	0,010
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Culture	0,007
<i>Bacillus cereus</i>	Culture	0,007
<i>Bacteroides fragilis</i>	Culture	0,025
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	0,002
<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	0,005
<i>Candida albicans</i>	Culture	0,004
<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	0,002
<i>Clostridium difficile</i>	Culture	0,002
<i>Clostridium perfringens</i>	Culture	0,002
<i>Clostridium sordellii</i>	Culture	0,003
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Culture	0,004
<i>E. coli</i> (O6)	Culture	0,003
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Culture	0,000

<i>Enterobacter cloacae</i>	Culture	0,002
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	0,007
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Culture	0,008
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	0,008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	0,009
Rotavirus	Surnageant de culture cellulaire	0,010
<i>Salmonella enteritidis</i>	Culture	0,007
<i>Salmonella typhimurium</i>	Culture	0,007
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	0,005
<i>Shigella flexneri</i>	Culture	0,007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	0,007
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Culture	0,009
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Culture	0,008

13.3. Précision :

La reproductibilité du test RIDASCREEN® Norovirus 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, couvrant l'ensemble de la plage de mesure des valeurs négatives à fortement positives. Les valeurs moyennes et le coefficient de variation (CV) ont été déterminés pour trois lots de trousse. Pour ce qui est de la reproductibilité intra-test, les références de dix jours de travail différents ont été mesurées en double, avec deux passages par jour. Les mesures ont été effectuées par trois techniciens et trois lots de trousse. La reproductibilité inter-lots a été déterminée sur les trois lots de trousse. Comme on s'y attendait, les résultats de la référence 6 ont été négatifs pour toutes les analyses. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Précision du test RIDASCREEN® Norovirus ELISA

Référence Valeur moyenne/CV		Intra-test			Inter-tests			Inter-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1-3
1	VM [DO 450/620]	2,295	2,254	2,141	2,090	2,148	2,109	2,116
	CV (%)	5,86%	5,00%	5,75%	13,08%	10,23%	13,40%	4,79%

2	VM [DO 450/620]	1,524	1,617	1,482	1,499	1,574	1,414	1,496
	CV (%)	5,79%	5,48%	4,43%	13,23%	16,24%	18,10%	7,58%
3	VM [DO 450/620]	1,126	1,193	0,738	1,168	1,199	1,189	1,185
	CV (%)	6,19%	6,46%	7,06%	11,77%	13,61%	20,32%	6,60%
4	VM [DO 450/620]	0,578	0,655	0,577	0,649	0,666	0,586	0,634
	CV (%)	8,46%	5,46%	10,09%	16,22%	13,16%	19,87%	4,80%
5	VM [DO 450/620]	0,315	0,387	0,335	0,318	0,325	0,301	0,315
	CV (%)	5,80%	7,64%	8,02%	18,82%	17,17%	24,12%	7,39%
6	VM [DO 450/620]	0,009	0,022	0,036	0,019	0,017	0,011	0,016
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o

13.4. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Norovirus ELISA a été déterminée pour deux échantillons de selles natifs (un pour chacun des génotypes I et II), où la concentration en norovirus des échantillons avait été préalablement testée à l'aide du microscope électronique (ME) et de la RT-PCR en temps réel. Les deux échantillons ont été initialement pré-dilués à 20 % (1/5) afin d'obtenir une concentration virale adaptée pour le ME et la RT-PCR. Chaque échantillon pré-dilué a été utilisé pour produire six autres dilutions (série de 1 à des puissances de 10). Les solutions issues de ces six étapes de dilution ont été examinées avec le test RIDASCREEN® Norovirus ELISA (mesures triples), par ME et RT-PCR en temps réel. Les concentrations ont ensuite été calculées dans les différentes dilutions pour le décompte au microscope et la mesure par PCR. Le seuil de détection (LD) a été défini comme la concentration à laquelle le test ELISA n'obtenait plus de résultats positifs et a été exprimée soit en copies d'ARN par gramme de selles (PCR) soit en particules par gramme de selles (ME).

Dans le test RIDASCREEN® Norovirus, la LD pour le génotype 1 (GI) est de $1,51 \times 10^6$ copies d'ARN par gramme de selles ($1,18 \times 10^7$ particules par gramme de selles) et celle pour le génotype II (GII) est de $1,99 \times 10^6$ copies d'ARN par gramme de selles. En ce qui concerne l'étape de dilution GII antérieure, le nombre de particules ne pouvait plus être déterminé avec le microscope électronique ; cette valeur a donc été calculée en utilisant les étapes de dilution mesurées avant ce stade. Le résultat de ce calcul est de $1,22 \times 10^6$ particules par gramme de selles pour GII (voir tableau 4, colonne de gauche).

D'après les valeurs de LD calculées par gramme de selles, les limites de détection (LD) ont été déterminées pour les concentrations des analytes dans le mélange réactif (dilution à 1/11 de l'échantillon). Pour GI, les résultats étaient de $1,51 \times 10^5$ copies d'ARN par ml de mélange

réactif et de $1,18 \times 10^6$ particules par ml de mélange réactif. Pour GII, les résultats étaient de $1,99 \times 10^5$ copies d'ARN par ml de mélange réactif et de $1,22 \times 10^5$ particules par ml de mélange réactif (voir tableau 4, côté droit). Tous les résultats sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : LD avec le test RIDASCREEN® Norovirus

Génogroups	Dans la dilution en série		Dans le mélange réactif (1 volume d'échantillon [de la dilution en série] + 10 volumes de Diluent 1)	
	RT-PCR en temps réel [copies/ml]	ME [particules/g]	RT-PCR en temps réel [copies/ml]	ME [particules/g]
GGI	$1,51 \times 10^{6*}$	$1,18 \times 10^{7*}$	$1,51 \times 10^{5**}$	$1,18 \times 10^{6**}$
GII	$1,99 \times 10^{6*}$	$1,22 \times 10^{6*}$	$1,99 \times 10^{5**}$	$1,22 \times 10^{5**}$

*Calcul basé sur la dernière dilution ayant obtenu un résultat positif avec le ME ou la PCR

**Concentrations calculées dans une dilution spécifique du test dans le Diluent 1

14. 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 norovirus dans les concentrations indiquées :

sulfate de baryum (5 % p/p), lopéramide (antidiarrhéique, 5 % p/p), Pepto-bismol (antidiarrhéique, 5 % v/p), mucines (5 % p/p), cyclamate (édulcorant artificiel, 5 % v/p), sang humain (5 % v/p), mélange d'acide stéarique et d'acide palmitique (1/1, 40 % p/p), métronidazole (0,5) (antibiotique, 5 % v/p), diclofénac (0,00263 % v/p).

Annexe

Symboles spécifiques au test :

Plate	Microplaque
Diluent 1	Tampon de dilution d'échantillon
Wash	Tampon de lavage
Control +	Contrôle positif
Control -	Contrôle négatif
Conjugate 1	Conjugué 1
Conjugate 2	Conjugué 2
Substrate	Substrat
Stop	Réactif d'arrêt

Bibliographie

1. Corwin A. L. et al.: Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(6), 898-903 (1999).
2. Daniels N. A. et al.: A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: First molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *The Journal of Infectious Diseases*, 181, 1467-70 (2000).
3. Gaulin C. et al.: Transmission of calicivirus by a foodhandler in the pre-symptomatic phase of illness. *Epidemiol. Infect.* 123, 475-478 (1999).
4. Jiang X. et al.: Outbreaks of gastroenteritis in elderly nursing homes and retirement facilities associated with human caliciviruses; *Journal of Medical Virology* 50: 335-341 (1996).
5. Jiang X. et al.: Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein; *Journal of Virology* Vol. 66 No. 11, 6527-6532 (1992).
6. Kohn M. A., MD, et al.: An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters. *Jama* 273, 466-471 (1995).
7. Kukkula M. et al.: Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *The Journal of Infectious Diseases* 180, 1771-1776 (1999).
8. Lodder W. J. et al.: Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in Sewage. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 65 No 12 , 5624-5627 (1999).
9. Otsu R. et al.: Detection of small round structured viruses in stool specimens from outbreaks of gastroenteritis by electron microscopy and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta virologica* 44, 53-55 (2000).
10. Oyofe B. A. et al.: Norwalk-like virus and bacterial pathogens associated with cases of gastroenteritis onboard a U.S. navy ship. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(6), 904-908 (1999).
11. Payment P. et al.: Incidence of Norwalk virus infections during a prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illness. *Can. J. Microbiol.* 40, 805-809 (1994).
12. Pönkä A. et al.: An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidem. Infect.* 123; 469-474 (1999).
13. Prasad B. V. Venkataram et al.: X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* Vol. 286, (1999).
14. Schreier E. et al.: Molecular epidemiology of outbreaks of gastroenteritis associated with small round structured viruses in Germany in 1997/98; *Arch. Virol.* 145, 443-453 (2000).
15. Taylor M. B. et al.: An epidemiological investigation of Norwalk virus infection in South Africa. *Epidemiol. Infect.* 116, 203-206 (1996).
16. Wright Peter J. et al.: Small round-structured (Norwalk-like) viruses and classical human caliciviruses in southeastern Australia, 1980-1996. *Journal of Medical Virology* 55, 312-320 (1998).
17. Zheng D.P. et al. : Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346, 312-323 (2006).

18. Chan M.C.W. et al. : Fecal viral load and Norovirus associated gastroenteritis. Emerging infectious diseases (www.cdc.gov/eid) Vol. 12, No 8 (2006).
19. Román E. et al. : Acute viral gastroenteritis : proportion and clinical relevance of multiple infections in Spanish children. J.Med. Microbiol. 52, 435-440 (2003).
20. Okitsu-Negishi S. et al.: Detection of Norovirus Antigens from recombinant Virus-like particles and stool samples by a commercial Norovirus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit. J.Clin. Microbiol. 44, 3784-3786 (2006)
21. Castriciano S. et al. : Comparison of the RIDASCREEN[®] norovirus enzyme immunoassay to IDEIA NLV GI/GII by testing stools assayed by RT-PCR and electron microscopy. J.Virol.Methods (2007)