RIDASCREEN® Norovirus

3.ª generación

N.º producto: C1401

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

1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDASCREEN® Norovirus 3.a generación es un inmunoensayo enzimático para la identificación cualitativa de norovirus de los genogrupos I y II en muestras de heces humanas.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los *norovirus* son una causa significativa de gastroenteritis en todo el mundo, estimándose en 23 millones de casos al año solo en EE.UU. (1, 2). Están implicados a menudo en brotes infecciosos de instituciones y centros comunitarios, como centros de asistencia, hospitales, guarderías infantiles y presiones, o en barcos cruceros (3, 4, 5). Aunque los brotes de infección de norovirus pueden suponer una considerable carga para la salud pública, suelen tratarse generalmente como brotes de infección bacteriana (6).

La gastroenteritis causada por un norovirus se caracteriza por fuertes náuseas, vómito intenso y diarrea fuerte. El periodo de incubación es de 6 a 48 horas y los síntomas pueden persistir otras 12 a 60 horas. La dosis infecciosa de solo 100 partículas víricas es extremadamente baja y es la razón de que este virus se propague de forma muy efectiva de una persona a otra. El virus se excreta con el vómito y las heces y la formación de gotas de aerosol que transportan el virus hace que la ruta de transmisión aerogénica sea tan significativa como la vía fecal-oral. La evidencia es la suma rapidez con que la infección se propaga muchas veces en instituciones sociales comunitarias.

Salvo contadas excepciones, el virus se excreta durante un periodo de aproximadamente dos semanas, hecho que genera un riesgo de contagio adicional. Es posible reinfectarse con el norovirus porque, entre otras cosas, la acusada variabilidad impide desarrollar una inmunidad completa.

Los métodos de diagnóstico usuales de análisis de muestras de heces se limitan a la microscopía electrónica o, sobre todo, a la identificación molecular del genoma mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Puesto que estos métodos son relativamente laboriosos y requieren especialización y equipos de laboratorio específicos, se necesita una prueba de identificación más sencilla y rápida. Este ELISA, actualmente en su tercera generación de desarrollo continuo, es una respuesta a la altura de este reto. El ELISA RIDASCREEN® Norovirus con anticuerpos monoclonales permite una identificación muy específica y sensible de ambos genogrupos de norovirus.

3. Principio de ensayo

El test RIDASCREEN® Norovirus de 3.ª generación utiliza anticuerpos monoclonales específicos según el método tipo sandwich. La superficie de los pocillos de la placa está recubierta con anticuerpos específicos contra los antígenos de varios genotipos diferentes.

Una suspensión de la muestra de heces analizada y los controles se pipetean en los pocillos de la placa junto con anticuerpos monoclonales anti-norovirus biotinilados (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Si una muestra de heces contiene norovirus, se forma un complejo tipo sandwich compuesto de anticuerpos inmovilizados, los antígenos del norovirus y los anticuerpos conjugados con el complejo de biotina, estreptavidina y peroxidasa. En el siguiente paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido. En las muestras positivas, la adición de un sustrato provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vire de incolora a azul. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de norovirus presentes en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos monoclonales anti-norovirus
Diluent | 1	100 ml	Tampón de dilución de muestra, solución salina tamponada con proteína, lista para usar, color azul
Wash	100 ml	Tampón de lavado, solución salida tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal 0.1%
Control | +	2 ml	Control positivo (proteína de la cápside de *norovirus* inactivada); listo para usar
Control | -	2 ml	Control negativo (tampón de dilución de muestra), listo para usar
Conjugate | 1	13 ml	Anticuerpos anti-norovirus conjugados con biotina en solución proteica estabilizada; listo para usar, color azul
Conjugate | 2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada, listo para usar, color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar
Stop	8 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar

5. Reactivos y almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 - 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si se almacena a 2 - 8 °C, el tampón de lavado diluido puede utilizarse como máximo durante 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad.
Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se rompa el precinto de seguridad. Retornar las tiras de pocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas inmediatamente a 2 - 8 °C.
El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos suministrados

– Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

– Tubos de ensayo
– Pipetas desechables (ref. Z0001)
– Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
– Micropipeta de 50 - 100 µl y 1 ml
– Probeta (1.000 ml)
– Cronómetro
– Dispositivo de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
– Fotómetro para placas de pocillos (450 nm y filtro de referencia de 620 - 650 nm)
– Papel de filtro (toallas desechables)
– Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5 %

7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.
No pipetear las muestras y los reactivos con la poca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al manipular las muestras y lavar las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras. Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El control positivo del kit contiene proteína de cápside de norovirus inactivada. Debe tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales, igual que las muestras de los pacientes.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Respetar la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Las muestras de heces deben obtenerse lo antes posible, siempre en el plazo de tres días después de los primeros síntomas de diarrea. Guardar el material del ensayo a 2 - 8 °C hasta que se vaya a usar. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a -20 °C. No congelar y descongelar la muestra innecesariamente. Después de diluir una muestra de heces en tampón de dilución 1:11, puede almacenarse a 4 °C y utilizarse en un plazo de siete días.
No guardar las muestras de heces y los frotis rectales en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ensayo RIDASCREEN® Norovirus de 3.ª generación.
En caso de utilizar frotis rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.
La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

9. Procedimientos de ensayo

9.1. Información general

Los reactivos y pocillos Plate deben adquirir temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de la utilización. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después de usar, volver a almacenar las tiras de pocillos (en bolsas de aluminio) y los reactivos a 2 - 8 °C. Des
caso si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.
Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit.
No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o colocar encima un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado Wash con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado en baño maría a 37 °C para disolver los posibles cristales presentes.

9.3 Preparación de las muestras

Llenar un tubo de ensayo etiquetado con un 1 ml de tampón de dilución de muestra RIDASCREEN® Diluent | 1. Utilizar una pipeta desechable (ref. Z0001) para extraer una muestra de heces fluida (aprox. 100 µl) hasta justo por encima de la segunda marca y añadirla al tampón del tubo de ensayo para formar una suspensión. Para formar una suspensión con una muestra de heces sólida, añadir una cantidad equivalente (aprox. 50 - 100 mg) con una espátula o asa de siembra desechable.
Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice. Dejar reposar brevemente (10 min.) la suspensión para que sedimenten las partículas de heces gruesas; el sobrenadante clarificado de la suspensión puede usarse directamente en el ensayo. Si el procedimiento de ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante **debe** estar libre de partículas. En este caso, es aconsejable centrifugar la muestra a 2.500 G durante 5 minutos.

Nota:
Las muestras de heces diluidas en Diluent | 1 pueden analizarse en todos los RIDASCREEN® ELISA para los que se utilice Diluent | 1.

9.4. Primera incubación

Después de llenar un número suficiente de pocillos del portatiras, pipetear 100 µl del Control | + positivo, del Control | - negativo o de la suspensión de muestras de heces a los pocillos. Acto seguido, añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con biotina Conjugate | 1 y mezclar (golpeado suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 60 minutos.

9.5. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa local en materia de eliminación de residuos. Acto seguido, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar si el equipo está ajustado correctamente; solicitar los ajustes al fabricante, si es preciso. Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con ajustes y protocolos de trabajo validados. A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3., Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.

9.6. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina Conjugate | 2 en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 30 min.

9.7. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato Substrate. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 - 25°C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada Stop con objeto de detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcionalmente a 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de pocillos.

Nota:
En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se realiza correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (O.D.) de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado.
Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados

- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

Corte = extinción del control negativo + 0,15

11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba de una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la evaluación de la muestra es negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

12. Limitaciones del método

El test RIDASCREEN® Norovirus de 3.ª generación identifica los antígenos del norovirus en muestras de heces y detecta los dos genogrupos (I y II) causantes de diarrea en humanos. Aunque no se analizaron todos los genotipos y subtipos relacionados, pueden detectarse casi todos los genotipos identificados hasta la fecha en brotes de gastroenteritis siempre que la carga viral de la muestra no baje del límite de detección del ELISA en el momento del muestreo. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico.** Con este ELISA puede detectarse el virus excretado por personas asintomáticas (localización de contactos). La carga viral disponible es siempre el factor determinante.

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos. En la literatura se describen ampliamente infecciones dobles y múltiples con posibles patógenos

causantes de gastroenteritis que pueden diagnosticarse mediante métodos diferenciales. En muchos casos, los signos y síntomas clínicos son más acentuados que en las infecciones de origen simple.

Un resultado **negativo** no permite descartar la posibilidad de infección con norovirus. La explicación puede ser la excreción intermitente del virus, la realización del muestreo en una fase inadecuada (véase punto 8 "Obtención y almacenamiento de muestras"), una carga viral mínima o el manejo incorrecto de la muestra. Si la anamnesis del paciente da pie a sospechar una infección con norovirus, deberá repetirse la prueba con una muestra de heces diferente.

La obtención de un resultado **límite** puede tener como explicación una distribución irregular de los virus en la muestra de heces, una carga viral límite al iniciar el ELISA o un lavado insuficiente de los pocillos o puede indicar que la infección está en fase regresiva. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

El ELISA RIDASCREEN® Norovirus no se ha validado todavía para muestras de meconio, de forma que los resultados de estos análisis deben interpretarse con cautela. Se han utilizado diferentes productos de cuidado infantil, como cremas, aceites y bálsamos susceptibles de pasar del pañal a la muestra de heces al realizar el muestreo, para adulterar muestras de heces negativas para norovirus, encontrándose que no influyeron en los resultados del análisis. Las muestras de heces positivas para norovirus no resultaron tampoco afectadas en los análisis con los productos de marca señalados.

13. Rendimientos

13.1. Calidad del ensayo

En un estudio de validación con el ELISA RIDASCREEN® Norovirus de 3.ª generación se analizaron 60 muestras con el método de reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa (RT-PCR) en el marco de trabajos de diagnóstico rutinarios durante el invierno 2004/2005 del Instituto de Virología de la Universidad de Tecnología de Dresden, donde se congelaron (-20 °C) y almacenaron. Se identificaron asimismo otras 123 muestras del invierno de 2006 (enero a mayo) mediante RT-PRCR y se congelaron y almacenaron para posteriores usos. Los resultados de ambos grupos de muestras se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Correlación entre el ELISA RIDASCREEN® Norovirus de 3.ª generación y RT-PCR

		Grupo RIDASCREEN® **invierno 2004/5**		Grupo RIDASCREEN® **invierno 2006**	
		+	-	+	-
RT-PCR	**+**	28	2	55	15
	-	0	30	0	53

Sensibilidad:	93,3 %	78,6 %
Especificidad:	100,0 %	100,0 %
Valor predictivo positivo (VPP):	100,0 %	100,0 %
Valor predictivo negativo (VPN):	93,8 %	77,9 %
Exactitud:	96,7 %	87,8 %

13.2. Reactividad cruzada

Se analizaron diferentes microorganismos patógenos del tracto intestinal mediante el ELISA RIDASCREEN® Norovirus. Estos estudios se realizaron con suspensiones de bacterias o virus no diluidas con concentraciones de 10^6 a 10^9 organismos por ml. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos

Organismo	**Origen**	**[DO 450/620]**
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,010
Aeromonas hydrophila	Cultivo	0,007
Bacillus cereus	Cultivo	0,007
Bacteroides fragilis	Cultivo	0,025
Campylobacter coli	Cultivo	0,002
Campylobacter jejuni	Cultivo	0,005
Candida albicans	Cultivo	0,004
Citrobacter freundii	Cultivo	0,002
Clostridium difficile	Cultivo	0,002
Clostridium perfringens	Cultivo	0,002
Clostridium sordellii	Cultivo	0,003
E. coli (O26:H-)	Cultivo	0,004
E. coli (O6)	Cultivo	0,003

E. coli (O157:H7)	Cultivo	0,000
Enterobacter cloacae	Cultivo	0,002
Enterococcus faecalis	Cultivo	0,007
Klebsiella oxytoca	Cultivo	0,008
Proteus vulgaris	Cultivo	0,008
Pseudomonas aeruginosa	Cultivo	0,009
Rotavirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,010
Salmonella enteritidis	Cultivo	0,007
Salmonella typhimurium	Cultivo	0,007
Serratia liquefaciens	Cultivo	0,005
Shigella flexneri	Cultivo	0,007
Staphylococcus aureus	Cultivo	0,007
Vibrio parahaemolyticus	Cultivo	0,009
Yersinia enterocolitica	Cultivo	0,008

13.3. Precisión:

La reproducibilidad del ELISA RIDASCREEN® Norovirus se analizó con seis referencias representativas del rango de medida completo, desde negativo a positivo alto. Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes de los kits. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de diez días de trabajo diferentes, con dos ensayos por día. Las medidas fueron realizadas por tres técnicos sobre tres lotes de los kits. Se determinó la reproducibilidad entre lotes para los tres lotes de kits. Según lo esperado, los resultados de la referencia 6 fueron negativos en todos los análisis. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Precisión del ELISA RIDASCREEN® Norovirus

Referencia Media/CV		**Intraensayo**			**Interensayo**			**Interlote**
		Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1-3
1	MV [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	MV [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	MV [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	MV [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	MV [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	MV [DO 450/620]	0,009	0,022	0,036	0,019	0,017	0,011	0,016
	CV (%)	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**	**n/d**

13,4 Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica del ELISA RIDASCREEN® Norovirus se determinó para dos muestras de heces naturales (una para el genogrupo I y II, respectivamente) examinadas previamente para concentraciones de norovirus mediante bajo el microscopio electrónico (ME) y RT-PCR en tiempo real. Para obtener una concentración de virus adecuada para los análisis mediante ME y PCR, ambas muestras se diluyeron inicialmente hasta 20% (1:5). Con cada muestra prediluida se crearon otras seis diluciones (series de 1 a potencias de 10). Estos seis pasos de dilución se analizaron mediante el ELISA RIDASCREEN® Norovirus (mediciones triples) y mediante ME y RT-PCR en tiempo real. Las concentraciones en las diluciones individuales se calcularon para el recuento al microscopio y para la medición PCR. El límite de detección (LoD) se determinó para la concentración a partir de la cual el ELISA dejó de generar resultados positivos y se registró como copias de ARN por gramo de heces (PCR) o de partículas por gramo de heces (ME).
En el test RIDASCREEN® Norovirus, el LoD del genogrupo I (GI) es de 1,51 x 10^6 copias de ARN por gramo de heces (1,18 x 10^7 partículas por gramo de heces) y el LoD del genogrupo II (GII) es de 1,99 x 10^6 copias de ARN por gramo de heces. El número de partículas del último paso de dilución GII no pudo determinarse bajo el microscopio electrónico y el valor se calculó a partir de los pasos de dilución medidos antes de este punto. El resultado de este cálculo fue de 1,22 x 10^6 partículas por gramo de heces para GII (ver tabla 4, columna izquierda).
Tomando como base los valores LoD calculados por gramo de heces, se determinaron los límites de detección (LoD) para concentraciones de los analitos en la mezcla de la reacción (dilución 1:11 de la muestra). Para GI, estos resultados fueron 1,51 x 10^5 copias de ARN por ml de mezcla de reacción y 1,18 x 10^6 partículas por ml de mezcla de reacción. Para GII, los resultados fueron 1.99 x 10^5 copias de ARN por ml de mezcla de reacción y 1.22 x 10^5 partículas por ml de mezcla de reacción (ver tabla 4, lado derecho). Los resultados se resumen

en la tabla 4.

Tabla 4: LoD con RIDASCREEN® Norovirus

Genogrupos	En dilución seriada		En mezcla de la reacción (1 parte muestra (de dilución seriada) + 10 partes Diluent 1)	
	RT-PCR en tiempo real [copias/ml]	ME [partículas/g]	RT-PCR en tiempo real [copias/ml]	ME [partículas/g]
GGI	**$1{,}51 \times 10^{6*}$**	**$1{,}18 \times 10^{7*}$**	**$1{,}51 \times 10^{5**}$**	**$1{,}18 \times 10^{6**}$**
GGII	**$1{,}99 \times 10^{6*}$**	**$1{,}22 \times 10^{6*}$**	**$1{,}99 \times 10^{5**}$**	**$1{,}22 \times 10^{5**}$**

*Cálculo basado en la última dilución con resultado positivo en ME o PCR

**Concentraciones calculadas en dilución específica de ensayo en Diluent 1

14. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con muestras de heces positivas y negativas para norovirus en las concentraciones descritas:

sulfato de bario (5 % p/p), loperamida (antidiarreico; 5 % p/p), Pepto-Bismol (antidiarreico, 5 % v/p), mucinas (5 % p/p), ciclamato (edulcorante, 5 % v/p), sangre humana (5 % v/p), mezcla de ácido esteárico y ácido palmítico (1:1, 40 % p/p), metronidazol (0,5) (antibiótico 5 % v/p), diclofenaco (0,00263 % v/p).

Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de pocillos
Diluent | 1	Tampón de dilución de muestra
Wash	Tampón de lavado
Control | +	Control positivo
Control | -	Control negativo
Conjugate | 1	Conjugado 1
Conjugate | 2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	Reactivo de parada

Bibliografía

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. Oyofo 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)