

NOROVIRUS MonlabTest® MO-076004 20 TESTS

One-step immunochromatographic test for the differential detection of
Norovirus Genogroups I and II in human faeces



For *in vitro* use only. Store at 2° to 30°C.

PRINCIPLE

The Norovirus MonlabTest is a chromatographic immunoassay for the qualitative detection, in separate bands, of Genogroup I (GI) and Genogroup II (GII) of Norovirus in human faeces. A positive signal in either test bands provides a good indication that we may be in presence of a Norovirus infection which should draw the attention of the clinician. The test is based on the immunological capture of coloured microbeads during its moving along a membrane on which specific monoclonal antibodies against GI and GII have been immobilized in two separate bands.

Norovirus MonlabTest uses a combination of:

- 1) Red latex particles conjugated to specific antibodies against GII which cooperates with antibodies specific for GII located on the membrane under the control band.
- 2) Other red latex particles conjugated to specific antibodies against GI which cooperates with antibodies specific for GI located on the membrane above the control band.
- 3) Blue latex particles conjugated to an antigen recognized by an antibody specific for this antigen bound to the membrane forming the so called test control band.

In this test the sample is treated first with the sample diluent buffer (included in the kit) to achieve the extraction of the virus from the stool matrix. After the extraction, you just need to add a certain volume of supernatant onto the test strip and wait for 15 minutes.

When the extracted sample flows through the test membrane, the coloured particles migrate. In the case of a positive sample, specific antibodies on the membrane will capture the coloured particles covered by the antigen.

Depending on the virus content of the sample, different coloured lines will be visible. These lines are used for interpretation of results, following 15 minutes incubation at room temperature (see Figure 1).

INTENDED USE

DESCRIPTION OF NOROVIRUS

Noroviruses are a kind of single-stranded, positive-sense RNA viruses belonging to the family *Caliciviridae*^{1,2,3} (Sapoviruses also belong to this family, among others). They are highly contagious viruses whose main routes of transmission are: person-to-person contact and through contaminated food/water (in the U.S. is estimated that they account for 50% of gastrointestinal outbreaks by food poisoning). They often cause large outbreaks in closed communities in a variety of environments such as hospitals, nursing homes, schools, kindergarten, restaurants, cruises, ... where, once the virus has been introduced, the infection spreads very quickly. Several studies show that Noroviruses are responsible for almost 50% of gastroenteritis outbreaks worldwide (considering all outbreaks of any aetiology)³.

Human Noroviruses have been very difficult to study because of their high diversity and the lack of an efficient cell culture for *in vitro* replication as well as a suitable animal model. The cloning of genomes of Norovirus and expression of the viral capsid proteins in baculovirus and other expression systems, have allowed to obtain "virus-like particles" (VLP) which, once assembled, are able to recreate the real structure of the virus.

Norovirus capsid is composed of a single major structural protein, the capsid protein (VP1) which can be divided into two main domains: the shell (S) and the protruding domains (P)⁴. The expression of VP1 in a eukaryotic system allows to obtain empty structural particles similar to the native present in the virus (VLP) that have been used as a substitute for native Norovirus for many years in any research process⁵.

CLASSIFICATION OF NOROVIRUSES

Noroviruses are grouped into five Genogroups (GI to GV), of which GI and GII are involved in most acute cases of viral gastroenteritis in humans.

Within each Genogroup viruses are classified into Genotypes (GI.1, GII.1...). Over 25 different Genotypes have been described within Genogroups I and II. Of these, GII.4 is the most common Genotype representing around 60-80% of cases worldwide^{6,7}. Following are GII.2, GII.3 and GII.7 within GII and GI.1, GI.3 or GI.4 within GI⁴ although, in general, this Genogroup is rather less common than GII, representing less than 5%⁸.

Recent studies have shown that in recent years new variant strains of GII.4 have been identified, which arise as a result of genetic changes that, in some cases, affect only one amino acid in the sequence of the capsid protein but this is enough to make them different from previous GII.4 strains. This means that any type of immunity that an individual would have generated against GII.4 could be useless against these new strains. In short, a single Genotype is presented as a whole family, tremendously complex and variable over time⁷.

CHARACTERISTICS OF NOROVIRUS INFECTION

Although Noroviruses can be detected throughout the year, it has been clearly observed that there is a seasonal prevalence with peaks during autumn and winter³.

Norovirus infection has an incubation period of 24-48 h and is characterized by nausea, vomiting, abdominal pain, fever, ... Acute symptoms usually appear for 1-3 days, although safety hygiene actions must be maintained for a minimum of two weeks (the elimination of the virus in faeces may continue for days, even weeks); the patient may remain asymptomatic from third or fourth day after onset of symptoms⁹.

After overcoming the infection, immunity to Norovirus is usually incomplete and temporary (about 6 months) as well as specific for a particular Genotype¹⁰. Given the high genetic variability of Noroviruses, individuals are likely to be infected several times throughout their lifetime. This may explain the high rates of infection that occur in all ages at an outbreak level. Recent studies suggest that susceptibility to Norovirus infection may be genetically determined¹¹.

MATERIALS PROVIDED

- 20 cassettes
- 20 vials with diluent (1,5mL)
- 20 non-graduated disposable plastic pipettes (yellow)
- Instructions for use

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

- Vortex
- Stopwatch

PRECAUTIONS

1. Patient specimens (faeces) should be handled with caution as they may contain infectious agents. All the necessary protections should be used throughout handling.
2. The sample dilution buffer contains sodium azide as anti-microbial agent. Avoid direct contact with skin and mucous membranes. Dispose of appropriately. Do not use the buffer if signs of contamination are present.
3. Do not eat, drink, smoke or prepare or store food in areas where reagents or samples are handled.
4. Once completed the procedure, clean work surfaces with soap and water and finish disinfecting with a suitable solution. Finally, discard the gloves and then wash hands first with soap and water rubbing them well.
5. Do not exchange components from one kit lot to another.
6. Before use, allow all kit components and stool samples to reach room temperature, as cold reagents and/or samples can reduce test functionality. 20 to 30 minutes are recommended to reach room temperature.
7. Use the reagents only *in vitro*.
8. Do not use kit components beyond their expiration date.
9. In case of package damage, the product may be used if none of its components has been damaged.
10. It's very important to add the correct volume of extracted sample to the reaction device. If the amount is lower than required, the chromatography may not be completed as the sample does not reach the reaction area, if it is bigger, brown lines may appear instead of red or blue lines.
11. Used product should be disposed of according to applicable laws.
12. Do not use the test if any coloured lines appear in the result area before using the test.
13. It is critical to collect the correct sample quantity: approximately **110 mg** of a **solid sample** (a **small ball of 5 mm in diameter**). If the **sample is semi-liquid** (unable to take it with a pipette), take a sample amount so that it completely **covers the grooves of the stick** attached to the vial cap and **110 µl** of a liquid sample (**4 drops** if the disposable pipettes included in the kit are used). These quantities are extracted in the sample diluent supplied with the vials provided in the kit. An excess of sample in relation to the amount of buffer added prevents the chromatography from running correctly; this is especially critical in the case of solid samples, since it is harder to obtain an appropriate quantity.
14. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and lotification.

STORAGE AND STABILITY

Product may be stored at any temperature between 2 and 30°C. The expiry date is printed on the tubes or aluminium packages.

SAMPLES

- This test is designed for the analysis of human faecal samples.
- It is recommended to collect the stool sample as soon as symptoms appear (diarrhoea and vomiting, especially) as the elimination of virus in faeces is greatest during the first three days from the onset of symptoms.
- Do not use samples collected in transport media or added with preservatives (such as formalin, SAF, PVA or similar) or enrichment media as their presence could interfere with the proper performance of the test.
- The use of **fresh untreated samples** is highly recommended. If they have to be stored for some time, they can be stored in the refrigerator (+2-8°C) for 1 or 2 days. For a longer storage, they should be frozen at -20°C, considering that some samples lost immunoreactivity after being frozen.
- Pay special attention when analyzing haemorrhagic samples as they often give false positive results when the blood content is high. An indicator of this destabilization of the test is usually the alteration of the colour in the control band (tends to show a purple or dark blue colour).
- In case of freezing, thaw the samples completely at room temperature prior to analysis. Avoid freezing-thawing cycles for the faecal samples as the immunological recognition of virus can be altered.

PREPARATION OF FAECAL SAMPLES

General Note: all the necessary protections should be used throughout the test procedure due the handling of infectious samples. Once the work is concluded, do not forget to comply with the hygiene procedures detailed in point 4 of the "Precautions" section.

1. Homogenize previously the sample to get an aliquot as much representative as possible.
2. Unscrew the cap from the vial with caution in order not to spill the sample diluent buffer. With **solid samples**, take with the stick attached to the vial cap an approximate amount of **110 mg** of faeces (a small portion of **5 mm in diameter**). If the sample is **semi-liquid** (unable to take it with a pipette), take a sample amount so that it completely **covers the grooves of the stick** attached to the vial cap. With **liquid samples**, take a volume of **110 µl** (**4 drops** if the disposable pipettes included in the kit are used).
3. Carefully add the sample into the vial containing the dilution buffer. Screw the cap well and shake vigorously to ensure a homogeneous mixture.



PROCEDURE

Once the samples have been prepared as described in previous section, the procedure is as follows:

1. Remove the reaction device from the aluminium pouch. Discard the desiccant bag as it only serves to preserve the test from moisture.
2. Break the top end of the vial stopper.
3. Put the vial upside down and add **3 drops** to the sample area of the reaction device (round window marked with an arrow).
4. Wait for **15 minutes**, read and interpret the results.

RESULTS

The five results shown in Figure 1 are an example of the results that can be obtained with the Norovirus MonlabTest.

Three different coloured bands can be distinguished:

Blue band: is the control band indicating a proper test performance.

Upper red band: indicates the presence of Norovirus Genogroup I in the sample.

Lower red band: indicates the presence of Genogroup II in the sample.

The control blue band should always appear. The additional presence of any red band indicates the presence of Norovirus in the sample.

Result 1: NEGATIVE result: a single transverse **BLUE** line appears in the middle area of reaction device along with the letter "C" marked on the plastic cassette. This band is the control band and should always appear indicating that chromatography takes place normally.

Result 2-4: POSITIVE results

Result 2. Detection of GII: a **BLUE** band (control) and a **RED** band 3 mm below the control band aligned with the label "T1" marked on the casing appear. The band intensity depends on virus concentration in the sample.

Result 3. Detection of GI: a **BLUE** band (control) and a **RED** band 3 mm above the control band aligned with the label "T2" marked on the casing appear. The band intensity depends on virus concentration in the sample.

Result 4. Detection of GI and GII: a **BLUE** band (control) along with two **RED** bands (one above -GI- and one below -GII- the control band) appear.

Result 5: INVALID results: the blue control band does not appear or the blue colour of this band is clearly altered (very dark blue or a purple colour), also nonspecific colours in the positive bands (different from red) are invalid results. In general, any colour combination different from those indicated in results 1-4 indicates an anomalous test performance.

Possible reasons are:

- Some reagents have got damaged or the test has expired.
- The sample was not prepared according to the instructions of use.
- High blood content in the sample.

In the event of an invalid result it is recommended that another test is run, strictly following the protocol described in this manual. For bloody samples, it is advisable the use of an alternative technique because the problem of destabilization does not usually depend on the cassette but of the sample matrix.

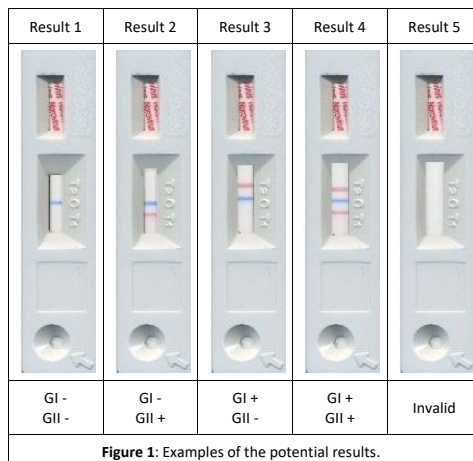


Figure 1: Examples of the potential results.

Any line that appears beyond 15 minutes because of the nature of the sample has no diagnostic value.

NOTE: the final and definitive diagnosis is established by the clinician. This test only detects Norovirus in a sample but is not an argument to conclude that the person has an infection with Norovirus.

WARNING: Including our controls with an established result is recommended to ensure that the data obtained are correct.

PROCEDURE LIMITATIONS

1. The Norovirus MonlabTest is intended for the differential identification of Norovirus Genogroups I and II by detecting its presence in human faeces provided that the viral load is equal to or higher than the detection limit of the assay.
2. This is a qualitative, not quantitative test, although the intensity of positive bands relates to the amount of detectable virus in the stool sample.
3. Over 200 stool samples were assessed to ensure proper test performance. The correlation of results with other techniques (RT-PCR, ELISA and rapid tests) was good. However, this study does not exclude potential interference in test performance when analysing other faecal samples.

4. Norovirus MonlabTest has not been validated with all Genotypes able to infect humans and, therefore, the test may fail to detect some Norovirus due to the high antigenic diversity of the circulating strains.
5. Insufficient sample amount may lead to extremely weak positive results. In this case, repeat the test with a larger amount of sample while maintaining the recommended ratio to the volume of sample diluent. On the other hand, a sample excess can cause the test to run very slowly and even prevent the test to perform properly (the control line is not visible). In this event, the test must be repeated with a lower sample amount (see section "Preparation of Faecal Samples").
6. A negative result does not exclude the possibility of a Norovirus infection. The failure in the detection of Norovirus may be the result of factors such as: taking the sample at an incorrect time of disease (when a low amount of virus is eliminated in the faeces), an incorrect sample storage, an inadequate handling of the sample, the presence of a Norovirus Genotype not detected by the strip (as the test has not been validated with all Genotypes able to infect humans and may fail to detect any of them).
7. A positive result does not exclude the presence of other pathogens; furthermore, a co-infection of Norovirus with other microorganisms may occur. In this sense, note that the most common co-infections of Norovirus often occur with parasites, especially with *Giardia lamblia* followed by *Cryptosporidium parvum*¹². In any case, co-infections can only be clarified by a differential diagnosis.
8. It is observed that faecal samples with high blood content may interfere negatively with the test. In this case, specificity problems may appear with Norovirus negative samples. This destabilization of the test is often accompanied by an alteration in the colour of the control band; a purple or dark blue colour appears instead of the expected light blue (see images in "Results Reading" section).
9. Test results should be interpreted in conjunction with information available from epidemiological studies, patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.

SENSIBILITY AND SPECIFICITY

ANALYTICAL SENSITIVITY

The internal standard to validate the manufactured lots is a mixture of "virus like particles" GI.1+GII.4 as they are the most representative and common genotypes within each genogroup.

A mean sensitivity of 6.25 ng/mL is obtained for NoV GI.1 and a mean sensitivity of 0.75 ng/mL for NoV GII.4 though up to 1.5 ng/mL and 0.1 ng/mL are usually detected for NoV GI and NoV GII respectively.

It is important to note that the detection limit of the test was also analyzed using real stool samples. Values were consistent with those obtained from internal standards. These results demonstrate the robustness of the test.

DIAGNOSTIC SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The sensitivity and specificity of the Norovirus MonlabTest was assessed by measuring a total of **96 negative samples**, **23 positive GI samples** and **100 positive GII samples**, characterized by RT-PCR (reference technique). All samples analyzed were frozen.

The following results were obtained:

Total Sensitivity: 85%

GI Sensitivity: 87%

GII Sensitivity: 85%

Specificity: 96%

It can be seen that the specificity of the Norovirus test is very high, higher than 95%. With respect to sensitivity, it is very important to analyse the values with caution taking into account that the reference technique (RT-PCR) is ultra-sensitive and sometimes it might detect as positive samples belonging to asymptomatic patients or patients who have overcome the disease. Anyway, sensitivity values around 85% for both GI and GII, are high ones for a rapid test.

REPEATABILITY

Ten replicates of each of the three concentrations established as PC ("positive control"), LPC ("low positive control") and NC ("negative control") with our internal standard were measured on the same day by the same person. A 100% repeatability was obtained with these three critical concentrations indicating a high intra-assay precision of the test.

REPRODUCIBILITY

INTER-DAY PRECISION

Using a single lot of Norovirus test a sensitivity curve is measured through four days spaced in time. The results were very reproducible (the same sensitivity for both GI and GII through the four days of measurement).

INTER-OPERATOR PRECISION

Five operators measured in duplicate a sensitivity curve. Differences were observed but in no case exceeded 1 two-fold dilution.

INTER-LOT PRECISION

Using three different lots of Norovirus test a sensitivity curve was measured in duplicate. The analysis was performed by the same person on the same day. Only differences below to 1 two-fold dilution were observed, acceptable and tolerable for the assay.

The differences found in the different "Reproducibility" sections are acceptable for a qualitative immunochromatographic technique with its inherent variability.



HOOK EFFECT

The maximum amount of Norovirus that a person can eliminate during the acute phase of disease is about 10^{12} particles/g of stool¹³, which is equivalent to 7.5×10^{10} particles/mL taking into account that Norovirus MonlabTest uses a sample extraction of 75 mg of stool in 1 mL of buffer. Considering an approximate equivalence between VLPs and mass of: 1 µg equal to 5.87×10^{10} VLPs/mL, 7.5×10^{10} particles/mL are about 1280 ng/mL of VLP. For excluding Hook Effect, a maximum concentration of 40000 ng/mL of both GI.1 and GI.4 was measured with the Norovirus test and, in both cases, positive results were obtained. These concentrations are about 6400-fold the mean sensitivity reached for GI.1 and about 53300-fold the mean sensitivity reached for GI.4 (see section "Analytical Sensitivity"). It is concluded that Hook Effect is not a problem for this test.

INTERFERING SUBSTANCES

The substances indicated in the below table at the concentration specified did not interfere with the results of the test when added to stool samples (positive and negative ones):

Racecadotril	5% (p/v)	Ibuprofen	20% (p/v)
Cimetidine	10% (p/v)	Acetylsalicylic acid	30% (p/v)
Loperamide	5% (p/v)	Edulcorant	5% (p/v)
Metronidazole	10% (p/v)	Palmitic acid	40% (p/v)
Omeprazole	3% (p/v)	Barium Sulphate	5% (p/v)
Ampicillin	15% (p/v)	Mucin	5% (p/v)

CROSS REACTIVITY

The Norovirus MonlabTest was evaluated against different micro-organisms likely to be present in the intestinal tract at any time in a sufficiently high concentration. No cross-reactivity was detected with any of the following microorganisms:

BACTERIA:

Aeromonas baumannii, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Bacillus spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli O111*, *Escherichia coli O127*, *Escherichia coli O26*, *Escherichia coli O55*, *Escherichia coli O157:H7*, *Hafnia alvei*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus casei BL23*, *Lactococcus lactis MC1363*, *Listeria monocitogenes*, *Morganella morganii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteric serogroup B*, *Salmonella enteric serogroup D*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

VIRUSES:

Astrovirus, *Adenovirus*, *Enterovirus*, *Rotavirus strain Wa*, *Rotavirus*, *Sapovirus*, *virus Aichi*.

FUNGI/PARASITES/OTHER:














Blastocystis hominis, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia*.

REFERENCES

- Atmar RL and Estes MK. *Diagnosis of non-cultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses*. Clinical Microbiology Reviews, 2011. Vol: 14 (pp: 15-37).
- Ribes Fernández JM and Buesa Gómez J. *Infecciones por Norovirus*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. Vol: 28 (pp: 51-55).
- Patel MM, Hall AJ, Vinjé J and Parashar UD. *Noroviruses: a comprehensive review*. Journal of Clinical Virology, 2009. Vol: 44 (pp: 1-8).
- Xerry J, Gallimore CI, Iturriza-Gómara M and Gray JJ. *Genetic characterization of Genogroup I Norovirus in outbreaks of gastroenteritis*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. Vol: 48 (pp: 2560-2562).
- Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS and Middaugh CR. *Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. Vol: 281 (pp: 19478-19488).
- Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolomé R, Vanaclocha H, Torner N and Domínguez A. *Sequential evolution of Genotype GI.4 Norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain*. Journal of Medical Virology, 2008. Vol: 50 (pp: 1288-1295).
- Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E and Koopmans M. *Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GI.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance*. Eurosurveillance, Jan-Mar 2008. Vol: 13 (Issues 1-3).
- Okame M, Akihara S, Hansman G, Hainian Y, Tran HT, GiaPhan T, Yagyu F, Okitsu S and Ushijima H. *Existence of multiple Genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of Norovirus infection in Japan*. Journal of Medical Virology, 2006. Vol: 78 (pp: 1318-1324).
- Furuya D, Kuribayashi K, Hosono Y, Tsuji N, Furuya M, Miyazaki K and Watanabe N. *Age, viral copy number, and immunosuppressive therapy affect the duration of norovirus RNA excretion in inpatients diagnosed with norovirus infection*. Jpn. J. Infect. Dis, 2011. Vol: 64 (pp: 104-108).
- Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY and Atmar RL. *Serological correlate of protection against Norovirus-induced gastroenteritis*. Journal Infection Disease, 2010. Vol: 202 (pp: 1212-1218).
- Waqas Nasir. *A study of Norovirus-HBGA interactions*. Chalmers University of Technology. University of Gothenburg, Sweden. December 2009.

- Arias Castellanos I and González Quiceno M. *Determinación de la coinfección entre enterobacterias, parásitos y Norovirus en niños de edades entre tres meses y cinco años con enfermedad diarreica aguda en los barrios arabia y Jerusalén de la localidad de ciudad Bolivar*. Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá (<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis372.pdf>).
- Hoonmo L. Koo and Herbert L. DuPont. *Noroviruses as a potential cause of protracted and lethal disease in immunocompromised patients*. Clinical Infectious Disease, 2009. Vol: 49 (pp: 1069-71).

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	Manufactured by		For in vitro diagnostic use
	Do not re-use		Please read pack insert
	Contains sufficient for <n> tests		Dry storage
	Catalogue number		Store at
	Lot number		Expiry date
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices		Dilution buffer
	Reagent		



NOROVIRUS MonlabTest® MO-076004 20 TESTS

Test inmunocromatográfico en un solo paso para la
detección diferencial de los Genogrupos I y II de Norovirus en heces



IVD

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar entre 2 y 30°C.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El inmunoensayo cromatográfico Norovirus MonlabTest es un procedimiento para la detección cualitativa, en bandas independientes, del Genogrupo I (GI) y del Genogrupo II (GII) de Norovirus en heces humanas. Una señal positiva en cualquiera de las dos bandas del test proporciona un buen indicio de que podemos estar ante una infección por Norovirus lo que debería atraer la atención del clínico.

El test está basado en la captura inmunológica de micropartículas coloreadas cuando pasan a través de una membrana sobre la que se han inmovilizado anticuerpos monoclonales frente al GI y GII en dos bandas separadas.

El test Norovirus MonlabTest utiliza una combinación de:

- 1) partículas de látex rojas conjugadas a anticuerpos específicos frente al GII que cooperan con anticuerpos específicos para GII situados en la membrana bajo la banda de control.
- 2) partículas de látex rojas conjugadas a anticuerpos específicos frente al GI que cooperan con anticuerpos específicos para GI situados en la membrana sobre la banda de control.
- 3) partículas de látex azules conjugadas a un antígeno reconocido por un anticuerpo específico para dicho antígeno unido a la membrana conformando la llamada banda de control del test.

En este test la muestra se trata, en primer lugar, con el tampón diluyente de la muestra (incluido en este kit) para conseguir la extracción del virus a partir de la matriz fecal. Tras la extracción, solo se necesita añadir un volumen determinado de sobrenadante en la tira reactiva y esperar 15 minutos.

Cuando la muestra extraída fluye a través de la membrana del test, las partículas coloreadas migran. En el caso de una muestra positiva, los anticuerpos específicos presentes en la membrana capturarán las partículas coloreadas recubiertas por el antígeno.

Diferentes líneas de color serán visibles, dependiendo del contenido de virus en la muestra. Estas líneas se usan para interpretar el resultado a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (ver Figura 1).

SIGNIFICADO CLÍNICO

Descripción de Norovirus

Los Norovirus son un tipo de virus de RNA de cadena sencilla en sentido positivo pertenecientes a la familia *Caliciviridae*^{1,2,3} (a esta familia también pertenecen, entre otros, los Sapovirus). Son virus altamente contagiosos cuyas principales vías de transmisión son: contacto persona a persona y a través de alimentos/aguas contaminadas (se calcula que en EEUU son responsables del 50% de los brotes gastrointestinales por intoxicación alimentaria). Suelen causar grandes brotes en comunidades cerradas en una gran variedad de ambientes tales como hospitales, hogares de ancianos, escuelas, guarderías, restaurantes, cruceros, ... donde una vez que el virus se ha introducido, la infección se propaga muy rápidamente. Varios estudios demuestran que los Norovirus son responsables de casi un 50% de los brotes de gastroenteritis en todo el mundo (considerando todos los brotes de cualquier etiología)³.

Los Norovirus humanos han sido muy difíciles de estudiar debido a que presentan una gran diversidad y a la falta de un cultivo celular eficiente para su replicación *in vitro*, así como a un modelo animal adecuado.

La clonación de los genomas de Norovirus y la expresión de las proteínas de la cápside viral en baculovirus y otros sistemas de expresión, han permitido obtener las "partículas similares al virus" (VLP) que, una vez que se ensamblan, son capaces de recrear la estructura real del virus.

La cápside de los Norovirus está compuesta por una única proteína estructural importante, la proteína de la cápside (VP1), que se puede dividir en dos dominios principales: la cáscara (S) y los dominios que sobresalen (P)⁴. La expresión de VP1 en un sistema eucariota permite obtener partículas estructurales vacías similares a las nativas presentes en el virus (VLP) que han sido utilizadas como un sustituto del Norovirus nativo desde hace muchos años en cualquier proceso de investigación⁵.

Clasificación de los Norovirus

Los Norovirus se agrupan en cinco Genogrupos (GI a GV), de los cuales GI y GII están involucrados en la mayoría de los casos agudos de gastroenteritis virales en los seres humanos.

Dentro de cada Genogrupo los virus se clasifican en Genotipos (GI.1, GI.1, ...). Más de 25 Genotipos diferentes se han descrito dentro de los Genogrupos I y II. De ellos, GI.4 es el genotipo más frecuente representando en torno a un 60-80% de los casos en todo el mundo^{6,7}. A continuación se encuentran GI.2, GI.3 y GI.7 dentro del GI y GI.1, GI.3 o GI.4 dentro del GI⁴ aunque, en general, este Genogrupo es bastante menos frecuente que GII pudiendo llegar a representar menos de un 5%⁸.

Recientes estudios han demostrado que en los últimos años se han identificado nuevas cepas variantes de GI.4 que surgen como consecuencia de cambios genéticos que, en algunos casos, afectan a tan solo un aminoácido en la secuencia de la proteína de la cápside, pero esto ya les hace diferentes a las cepas GI.4 anteriores. Esto supone que cualquier tipo de inmunidad que hubiese generado un individuo frente a GI.4 no sirve de nada frente a estas nuevas cepas. En definitiva, un solo Genotipo se presenta como toda una familia tremendamente compleja y variable con el tiempo⁷.

Características de la infección por Norovirus

Si bien los Norovirus se pueden detectar durante todo el año, se ha observado claramente que existe una prevalencia estacional con picos durante el otoño e invierno³.

La infección de Norovirus presenta un periodo de incubación de 24-48 h y se caracteriza por náuseas, vómitos, dolor abdominal, fiebre, ... Los síntomas agudos suelen aparecer durante 1-3 días si bien las medidas higiénicas de seguridad se deben mantener un periodo mínimo de dos semanas (la eliminación del virus por las heces puede continuar días, incluso semanas), pudiendo permanecer el paciente asintomático a partir del tercer o cuarto día de haber comenzado los síntomas⁹.

Después de superar la infección, la inmunidad frente a Norovirus suele ser incompleta y temporal (en torno a 6 meses) así como específica para un Genotipo concreto¹⁰. Teniendo en cuenta la gran variabilidad genética de los Norovirus, los individuos son propensos a ser infectados varias veces durante toda su vida. Esto puede explicar las altas tasas de infección que se dan en todas las edades a nivel de brotes. Estudios recientes sugieren que la susceptibilidad a la infección por Norovirus puede estar determinada genéticamente¹¹.

MATERIAL SUMINISTRADO	MATERIAL NECESARIO PERO NO PROPORCIONADO
<ul style="list-style-type: none"> - 20 casetes - 20 viales con el tampón de dilución de la muestra (1,5 mL) - 20 pipetas de plástico desechables no graduadas (amarillas) - Instrucciones de uso 	<ul style="list-style-type: none"> - Vórtex - Cronómetro

PRECAUCIONES

1. Las muestras de los pacientes (heces) deben ser manipuladas con cuidado ya que pueden contener agentes infecciosos. A lo largo de todo el proceso se deben usar todos los medios de protección requeridos.
2. El tampón de dilución de la muestra contiene azida de sodio como agente antimicrobiano. Evitar el contacto directo con la piel y las mucosas. Desechar de forma apropiada. No usar el tampón si manifiesta indicios de contaminación o precipitación.
3. No comer, beber, fumar, almacenar o preparar alimentos en la zona donde se manejan los reactivos y las muestras.
4. Una vez finalizada la tarea, limpiar las superficies de trabajo con agua y jabón y terminar desinfectando con una solución adecuada. Por último, eliminar los guantes y lavar las manos con agua y jabón frotándolas bien.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. Antes de usarlos, dejar que todos los componentes del kit y las muestras fecales alcancen la temperatura ambiente, pues reactivos y/o muestras frías pueden reducir la funcionalidad del test. Se recomiendan de 20 a 30 minutos para alcanzar la temperatura ambiente.
7. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
8. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
9. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
10. Es muy importante añadir el volumen correcto de muestra extraída al casete. Si es inferior al indicado, puede ser que no se realice la cromatografía porque no llegue suficiente muestra a la zona de reacción; si es superior, pueden aparecer líneas marrones en vez de rojas o azules.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. No usar el test si aparece alguna línea de color en la zona de resultados antes de empezar a usarlo.
13. Es muy importante tomar la cantidad adecuada de muestra: unos **110 mg** sin son **muestras sólidas** (una bolita pequeña de unos **5 mm de diámetro**), una **cantidad capaz de cubrir las estrías del palito** unido al tapón del vial si son **muestras semi-líquidas** (no se pueden tomar con la pipeta) y **110 µL** si son **muestras líquidas (4 gotas)** si se emplean las pipetas desechables proporcionadas por el kit; estas cantidades se extraen en el tampón de dilución de la muestra suministrado en los viales incluidos en el kit. Un exceso de muestra con respecto a la indicada podría impedir que la cromatografía transcurra de forma correcta; esto es especialmente crítico en el caso de muestras sólidas ya que no es tan sencillo tomar la cantidad recomendada de muestra.
14. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Se puede conservar a cualquier temperatura comprendida entre 2°C y 30°C. Su fecha de caducidad está impresa en los envoltorios de aluminio.

MUESTRAS

- Este test está diseñado para analizar muestras fecales humanas frescas.
- Se recomienda recoger la muestra fecal tan pronto como aparezcan los síntomas (diarreas y vómitos, sobre todo) pues la eliminación del virus por las heces es máxima durante los tres primeros días desde la aparición de los síntomas.
- No usar muestras recogidas en medios de transporte o se les hayan añadido agentes de conservación (como formalina, SAF, PVA o similares) o medios de enriquecimiento ya que su presencia podría interferir con la correcta ejecución del test.
- Se recomienda analizar muestras frescas sin tratar. Si se tienen que conservar durante un tiempo, pueden guardarse en el frigorífico (+2-8°C) durante 1 o 2 días. Para tiempos más largos, deben congelarse a -20°C teniendo en cuenta que algunas muestras pierden inmunoreactividad tras haber sido congeladas.
- Prestar especial atención cuando se analicen muestras hemorrágicas pues suelen dar problemas de inespecificidad cuando el contenido en sangre es elevado. Un indicio de esta inestabilización del test suele ser la alteración del color azul de la banda de control (tiende a mostrar un color morado o azul muy oscuro).



- En caso de congelación, descongelar totalmente las muestras a temperatura ambiente antes de proceder a su análisis. Evitar ciclos de congelación y descongelación con las muestras fecales ya que se puede alterar el reconocimiento inmunológico del virus.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

Nota General: usar todos los medios de protección requeridos a lo largo del desarrollo del test debido al manejo de muestras infecciosas. Una vez finalizado el trabajo, proceder con la higiene de acuerdo al punto 4 del apartado "Precauciones".

- Homogeneizar previamente la muestra con el fin de que sea lo más representativa posible.
- Desenroscar el tapón de dilución. Si las heces son **sólidas**, tomar con el palito unido al tapón del vial una cantidad de aproximadamente **110 mg** de heces (una pequeña porción de **5 mm de diámetro**). Si las heces son **semi-líquidas** (no se pueden tomar con la pipeta), tomar una **cantidad** de muestra de manera que **cubra por completo las estrías del palito unido al tapón del vial**. Si las heces son **líquidas**, tomar con una ayuda de una pipeta **110 µL (4 gotas)** si se emplean las pipetas desechables incluidas en el kit).
- Añadir cuidadosamente la muestra en el vial con el tampón de dilución. Enroscar bien el tapón y agitar vigorosamente para asegurar una mezcla homogénea.

PROCEDIMIENTO

Una vez que las muestras se han preparado como se indica en los apartados anteriores, se procede de la siguiente manera:

- Sacar el casete de reacción de la bolsa de aluminio. Desechar la bolsita de desecante puesto que solo sirve para preservar el test de la humedad.
- Romper el extremo superior del tapón del vial.
- Invertir el vial y añadir **3 gotas** en la zona de adición de la muestra (ventana circular señalada con una flecha). Tratar de no añadir partículas sólidas con la muestra.
- Esperar **15 minutos** para leer e interpretar el resultado.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Los cinco diagramas que se muestran en la Figura 1 son un ejemplo de los distintos resultados que se pueden obtener con el test Norovirus.

Se distinguen tres bandas coloreadas diferentes:

Banda azul: constituye la banda de control que indica un correcto funcionamiento del test

Banda roja superior: indica presencia del Genogrupo I de Norovirus en la muestra.

Banda roja inferior: indica presencia del Genogrupo II en la muestra.

La banda azul de control debe aparecer siempre. La presencia adicional de cualquiera de las dos bandas rojas, indica la presencia de Norovirus en la muestra.

Resultado 1: resultado **NEGATIVO**: solo aparece una línea transversal **AZUL** en la zona central del casete, alineada con la letra "C" marcada en la carcasa. Esta banda constituye la banda de control y debe aparecer siempre ya que indica que la cromatografía transcurre con normalidad.

Resultados 2-4: resultados **POSITIVOS**

Resultado 2. Detección de GII: aparece una banda **AZUL** (control) y una banda **ROJA** 3 mm por debajo de la banda de control, alineada con el rótulo "T1" marcado en la carcasa. La intensidad depende de la concentración del virus en la muestra.

Resultado 3. Detección de GI: aparece una banda **AZUL** (control) y una banda **ROJA** 3 mm por encima de la banda de control, alineada con el rótulo "T2" marcado en la carcasa. La intensidad depende de la concentración del virus en la muestra.

Resultado 4. Detección de GII y GI aparece una banda **AZUL** (control) junto a dos bandas **ROJAS** [una por encima (GI) y otra por debajo (GII) de la banda de control].

Resultado 5: resultados **NO VÁLIDOS**: no aparece la banda de control azul, el color azul de la banda de control aparece claramente alterado (azul muy oscuro o morado) o aparecen colores inespecíficos en las bandas positivas (diferentes al rojo). En general, cualquier combinación de colores diferente a las indicadas en los resultados 1-4, indica un funcionamiento anómalo del test.

Algunas de las causas que justifican este hecho pueden ser:

- algunos de los reactivos se han deteriorado o el test ha caducado.
- la muestra no se ha preparado de acuerdo a las instrucciones de uso.
- la muestra tiene un alto contenido en sangre.

Ante un resultado inválido, se recomienda repetir el test con un nuevo casete siguiendo estrictamente las instrucciones de uso anteriormente descritas. En el caso de las muestras con sangre, se aconseja el uso de una técnica alternativa pues el problema de la inestabilización no suele depender del casete empleado sino de la propia matriz de la muestra.

Toda línea que por la naturaleza de la muestra pueda aparecer pasados los 15 minutos de reacción no tendrá valor diagnóstico.

NOTA: el diagnóstico final y definitivo lo establece el médico clínico. Este test sólo detecta Norovirus en una muestra, pero no constituye un argumento para afirmar que la persona padece de una infección por Norovirus.

ADVERTENCIA: Se recomienda la inclusión de nuestros controles de resultado conocido para asegurar que los datos obtenidos son correctos.






Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Resultado 4	Resultado 5
				
GI - GII -	GI - GII +	GI + GII -	GI + GII +	test nulo

Figura 1: Modelos de posibles resultados.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El test Norovirus sirve para la identificación diferencial del Genogrupo I y del Genogrupo II de Norovirus detectando su presencia en heces humanas siempre y cuando la carga viral sea igual o superior al límite de detección del ensayo.
- Este test es cualitativo, no cuantitativo, aunque la intensidad de las bandas positivas está relacionada con la cantidad de virus detectable en la muestra fecal.
- Más de 200 muestras fecales fueron evaluadas para asegurar el correcto funcionamiento del test. La correlación de resultados con otras técnicas (RT-PCR, ELISA y tests rápidos) fue buena. Sin embargo, este estudio no excluye posibles interferencias en el funcionamiento del test al analizar otras muestras fecales.
- El test de Norovirus no ha sido validado con todos los Genotipos capaces de infectar a seres humanos y, en consecuencia, el test podría fallar en la detección de algunos Norovirus debido a la gran diversidad antigénica de las cepas circulantes.
- Con un defecto de muestra pueden aparecer resultados positivos muy débiles. En este caso se debe repetir el test con una cantidad mayor de muestra manteniendo la proporción recomendada con el diluyente de la muestra. Por otro lado, un exceso de muestra puede causar un desarrollo del test muy lento e incluso impedir el correcto desarrollo del test (no se ve la línea control). En este caso se debe repetir el test con una cantidad menor de muestra (ver apartado "Preparación de las muestras fecales").
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de una infección por Norovirus. La no detección de Norovirus puede ser resultado de factores como: la toma de muestra en un momento inadecuado de la enfermedad (cuando se elimina muy poco virus por las heces); un incorrecto almacenamiento de la muestra; un transporte inadecuado de la misma; presencia de un Genotipo de Norovirus no detectado por la tira (el test no ha sido validado con todos los Genotipos capaces de infectar a humanos y podría fallar en la detección de alguno de ellos).
- Un resultado positivo no excluye la presencia de otros agentes patógenos, incluso, puede darse una co-infección de Norovirus con otros microorganismos. En este sentido apuntar que las co-infecciones más frecuentes de Norovirus suelen darse con parásitos, sobre todo, con *Giardia lamblia* seguido por *Cryptosporidium parvum*¹². En cualquier caso, las co-infecciones sólo pueden esclarecerse mediante un diagnóstico diferencial.
- Se ha observado que muestras fecales con un alto contenido en sangre interfieren negativamente con el test, pudiendo aparecer problemas de inespecificidad con muestras que son negativas para Norovirus. Esta inestabilización del test suele ir acompañada de una alteración en la coloración de la banda de control; en lugar de un color azul claro, aparece un color azul muy oscuro o incluso morado (ver las imágenes en el apartado "Lectura de Resultados").
- Los resultados del test deben ser interpretados junto con la información disponible de los estudios epidemiológicos, valoración clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

El estándar interno para validar los lotes fabricados consiste en una mezcla de "virus like particles" GI.1+GII.4, por ser los genotipos más representativos y frecuentes dentro de cada genogrupo.

El valor de sensibilidad medio alcanzado se sitúa en torno a 6,25 ng/mL para Norovirus GI y en torno a 0,75 ng/mL para Norovirus GII si bien con elevada frecuencia se llegan a detectar hasta 1,5 ng/mL para Norovirus GI y hasta 0,1 ng/mL para Norovirus GII. Apuntar que el límite de detección del test también se ha analizado empleando muestras reales bien caracterizadas. Se obtuvieron valores coherentes con los obtenidos a partir de los estándares internos. Estos resultados evidencian la robustez del test.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA

La especificidad y la sensibilidad del test Norovirus se evaluaron analizando un total de **96 muestras negativas, 23 muestras positivas GI y 100 muestras positivas GII**, todas ellas estaban congeladas y caracterizadas a nivel de RT-PCR (técnica de referencia).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Sensibilidad Total: 85%

Sensibilidad GI: 87%

Sensibilidad GII: 85%

Especificidad: 96%



Se observa que la especificidad del test es muy elevada, superior al 95%. Respecto a los valores de sensibilidad, hay que valorarlos teniendo en cuenta que la técnica de referencia (RT-PCR) es ultra-sensible llegando incluso, a veces, a detectar como positivas muestras pertenecientes a pacientes asintomáticos o a pacientes que ya han superado la enfermedad. Un valor de sensibilidad en torno al 85%, tanto para GI como para GII, es muy alto para un test rápido.

REPETIBILIDAD

Diez réplicas de cada una de las tres concentraciones establecidas como NC ("negative control"), LPC ("low positive control") y PC ("positive control") del estándar interno se midieron el mismo día por la misma persona. Se obtuvo una repetibilidad del 100% con las tres concentraciones críticas lo que indica una alta precisión intra-ensayo del test.

REPRODUCIBILIDAD

PRECISIÓN INTERDÍA

Con un mismo lote del test Norovirus se mide una curva de sensibilidad a lo largo de cuatro días espaciados en el tiempo. Los resultados fueron muy reproducibles (obtenemos la misma sensibilidad tanto para GI como para GII los cuatro días de medida).

PRECISIÓN INTEROPERADOR

Cinco personas midieron por duplicado una curva de sensibilidad. Se observaron diferencias que, en ningún caso, fueron superiores a una dilución ½.

PRECISIÓN INTERLOTE

Con tres lotes distintos del test Norovirus se midió una curva de sensibilidad por duplicado. El análisis lo realizó una única persona el mismo día. Solo se apreciaron diferencias inferiores a una dilución ½, asumibles y tolerables por el ensayo realizado.

Las diferencias encontradas en los distintos apartados de "Reproducibilidad" son asumibles en una técnica inmunocromatográfica cualitativa con una variabilidad inherente a la misma.

EFEECTO HOOK

La cantidad máxima de Norovirus que una persona puede llegar a eliminar en la fase aguda de la enfermedad ronda las 10^{12} partículas/g hez²³ lo que equivale a $7,5 \times 10^{10}$ partículas/mL teniendo en cuenta que el test Norovirus de MonlabTest emplea una extracción de hez de 75 mg en 1 mL de tampón. Considerando una equivalencia aproximada entre VLPs y masa de: 1 µg igual a $5,87 \times 10^{10}$ VLPs/mL, unas $7,5 \times 10^{10}$ partículas/mL equivaldrían aproximadamente a 1280 ng/mL de VLP. Como se quiere ver el efecto de cantidades muy elevadas y por encima de valores que se pueden encontrar entre la población, se midieron concentraciones de GI.1 y de GII.4 de hasta 40000 ng/mL que supone estar unas 6400 veces por encima de la sensibilidad media alcanzada para GI.1 y unas 53300 veces para GII.4 (ver apartado de "Sensibilidad Analítica"). En ningún caso se observó disminución o anulación en la intensidad de las señales positivas.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

Las siguientes sustancias no mostraron ningún efecto en los resultados del test cuando fueron añadidas a muestras fecales (positivas y negativas) a las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Racecadotriilo	5% (p/v)	Ibuprofeno	20% (p/v)
Cimetidina	10% (p/v)	Ac. Acetilsalicílico	30% (p/v)
Loperamida	5% (p/v)	Edulcorante	5% (p/v)
Metronidazol	10% (p/v)	Ac. palmítico	40% (p/v)
Omeprazol	3% (p/v)	Sulfato de Bario	5% (p/v)
Ampicilina	15% (p/v)	Mucina	5% (p/v)

REACTIVIDAD CRUZADA

El test Norovirus MonlabTest se testó frente a distintos microorganismos susceptibles de estar presentes en el tracto intestinal en un momento dado a una concentración suficientemente elevada. No se observó reactividad cruzada con ninguno de los siguientes microorganismos:

BACTERIAS

Aeromonas baumannii, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Bacillus spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli O111*, *Escherichia coli O127*, *Escherichia coli O26*, *Escherichia coli O55*, *Escherichia coli O157:H7*, *Hafnia alvei*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus casei BL23*, *Lactococcus lactis MC1363*, *Listeria monocitogenes*, *Morganella morganii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enterica serogrupo B*, *Salmonella enterica serogrupo D*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexnerii*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus viridans*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*.

VIRUS

Astrovirus, Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus cepa Wa, Rotavirus, Sapovirus, virus Aichi.














HONGOS/PARÁSITOS/OTROS

Blastocystis hominis, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Atmar RL and Estes MK. *Diagnosis of non-cultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses*. Clinical Microbiology Reviews, 2011. Vol: 14 (p. 15-37).
- Ribes Fernández JM and Buesa Gómez J. *Infecciones por Norovirus*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010. Vol: 28 (pp: 51-55).
- Patel MM, Hall AJ, Vinjé J and Parashar UD. *Noroviruses: a comprehensive review*. Journal of Clinical Virology, 2009. Vol: 44 (pp: 1-8).
- Xerry J, Gallimore CI, Iturriza-Gómara M and Gray JJ. *Genetic characterization of Genogroup I Norovirus in outbreaks of gastroenteritis*. Journal of Clinical Microbiology, 2010. Vol: 48 (pp: 2560-2562).
- Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS and Middaugh CR. *Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles*. The Journal of Biological Chemistry, 2006. Vol: 281 (pp: 19478-19488).
- Buesa J, Montava R, Abu-Mallouh R, Fos M, Ribes JM, Bartolomé R, Vanaclocha H, Torner N and Domínguez A. *Sequential evolution of Genotype GII.4 Norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain*. Journal of Medical Virology, 2008. Vol: 50 (pp: 1288-1295).
- Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, Duizer E and Koopmans M. *Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance*. Eurosurveillance, Jan-Mar 2008. Vol: 13 (Issues 1-3).
- Okame M, Akihara S, Hansman G, Hainian Y, Tran HT, GiaPhan T, Yagyu F, Okitsu S and Ushijima H. *Existence of multiple Genotypes associated with acute gastroenteritis during 6-year survey of Norovirus infection in Japan*. Journal of Medical Virology, 2006. Vol: 78 (pp: 1318-1324).
- Furuya D, Kuriyayashi K, Hosono Y, Tsuji N, Furuya M, Miyazaki K and Watanabe N. *Age, viral copy number, and immunosuppressive therapy affect the duration of norovirus RNA excretion in inpatients diagnosed with norovirus infection*. Jpn. J. Infect. Dis, 2011. Vol: 64 (pp: 104-108).
- Reeck A, Kavanagh O, Estes MK, Opekun AR, Gilger MA, Graham DY and Atmar RL. *Serological correlate of protection against Norovirus-induced gastroenteritis*. Journal Infection Disease, 2010. Vol: 202 (pp: 1212-1218).
- Waqas Nasir. *A study of Norovirus-HBGA interactions*. Chalmers University of Technology. University of Gothenburg, Sweden. December 2009.
- Arias Castellanos I and González Quiceno M. *Determinación de la coinfección entre enterobacterias, parásitos y Norovirus en niños de edades entre tres meses y cinco años con enfermedad diarreica aguda en los barrios arabia y Jerusalén de la localidad de ciudad Bolívar*. Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de Ciencias, Bogotá (<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis372.pdf>).
- Hoonmo L. Koo and Herbert L. DuPont. *Noroviruses as a potential cause of protracted and lethal disease in immunocompromised patients*. Clinical Infectious Disease, 2009. Vol: 49 (pp: 1069-71).

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico in vitro
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Mantener seco		Contiene suficiente para <n> ensayos
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad
	Reactivo		Tampón de dilución
	Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro		

