

# Evaluación de dos métodos de detección antigénica por ELISA para el diagnóstico de brotes causados por norovirus

Juan Carlos Sanz<sup>a</sup>, Ana Revilla<sup>b</sup>, Marisa Fernández<sup>a</sup>, Nieves Herranz<sup>a</sup>, Silvia Moreno<sup>b</sup> y Alicia Sánchez-Fauquier<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio Regional de Salud Pública. Instituto de Salud Pública de la Comunidad de Madrid. <sup>b</sup>Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

**INTRODUCCIÓN.** El objetivo de este estudio fue evaluar dos ELISA para la detección de brotes por norovirus.

**MÉTODO.** Se estudiaron 165 muestras de heces de pacientes afectados en 30 brotes.

**RESULTADOS.** Considerando un criterio específico de consenso entre técnicas para la confirmación de brotes, la sensibilidad y especificidad fue para RIDASCREEN del 80 y 90% y para IDEIA del 80 y de 100%.

**CONCLUSIÓN.** Estas técnicas quizá podrían resultar útiles para la detección de brotes por norovirus en laboratorios que carezcan de técnicas moleculares.

**Palabras clave:** ELISA. Norovirus. Brotes.

Assessment of two methods of antigenic detection by ELISA for the diagnosis of norovirus outbreaks

**INTRODUCTION.** The aim of this study was to assess two ELISA techniques for the detection of outbreaks of norovirus.

**METHOD.** One-hundred and sixty-five fecal samples from patients affected in 30 outbreaks were studied.

**RESULTS.** On the basis of a specific consensus criterion between techniques for confirming outbreaks, the sensitivity and specificity was respectively 80% and 90% for RIDASCREEN, and 80% and 100% for IDEIA.

**CONCLUSION.** These techniques could be useful for rapid detection of norovirus outbreaks in laboratories that lack molecular confirmation techniques.

**Key words:** ELISA. Norovirus. Outbreaks.

Correspondencia: Dr. J.C. Sanz.  
Laboratorio Regional de Salud Pública.  
Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid.  
General Oráa, 15. 28006 Madrid. España.  
Correo electrónico: juan.sanz@salud.madrid.org

Manuscrito recibido el 13-1-2006; aceptado el 23-3-2006.

## Introducción

En nuestro medio cada vez son más frecuentes las descripciones de brotes de gastroenteritis causados por norovirus (NoV)<sup>1-4</sup>. Sin embargo, sólo una minoría de estos brotes llega a confirmarse mediante pruebas de laboratorio<sup>5</sup>. La levedad de la infección y la dificultad para disponer de procedimientos diagnósticos (microscopía electrónica [ME]<sup>4</sup> y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa [RT-PCR])<sup>2,3</sup> pueden hacer que esta enfermedad se infravalore. En este sentido, los nuevos métodos de enzimoimmunoensayo (ELISA), capaces de detectar antígenos virales en heces, constituyen una alternativa diagnóstica prometedora. El objetivo de este estudio fue evaluar dos técnicas de ELISA (RIDASCREEN Norwalk-like Virus ELISA r-biopharm, Germany e IDEIA<sup>TM</sup> NLV, Dako Cytomation Ltd., Ely, Reino Unido) para la detección de brotes por NoV.

## Materiales y métodos

Se estudiaron 165 muestras de heces, sobre las que se disponía de información epidemiológica. Estas muestras correspondían a 165 pacientes distintos afectados en 30 brotes, bajo sospecha inicial de gastroenteritis vírica, ocurridos en la Comunidad de Madrid entre junio de 2003 y diciembre de 2004. La tabla 1 muestra las principales características epidemiológicas de los brotes estudiados.

Todas las muestras fueron conjuntamente procesadas por RT-PCR<sup>5</sup> y las dos técnicas de ELISA evaluadas (RIDASCREEN Norwalk-like Virus ELISA r-biopharm, Alemania e IDEIA<sup>TM</sup> NLV, Dako Cytomation Ltd., Ely, Reino Unido). El número de muestras de heces procesadas en cada brote osciló entre 2 y 19 (media 5,5, DE 4,5). En todas las muestras se excluyó por coprocultivo la presencia de *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Campylobacter* sp. Otros virus entéricos (rotavirus, adenovirus y astrovirus) se investigaron mediante métodos moleculares y ELISA específicos (IDEIA Rotavirus, IDEIA Adenovirus e IDEIA Astrovirus; Dako Cytomation Ltd., Ely, Reino Unido).

La técnica de RT-PCR se consideró como referencia para el cálculo de la sensibilidad y especificidad de los dos métodos de ELISA en relación con la totalidad de muestras estudiadas.

Para la detección de brotes causados por NoV se establecieron dos posibles criterios de confirmación basados en un consenso entre técnicas:

a) Criterio sensible de detección: se consideró brote ante al menos un resultado positivo para NoV en una misma muestra por más de una técnica (RT-PCR, DAKO y/o RIDASCREEN) y en alguna otra muestra diferente del mismo brote por al menos una de las tres técnicas. En estas situaciones se estimó que cada técnica de ELISA detectó el brote cuando se obtuvo al menos un resultado positivo.

TABLA 1. Características epidemiológicas de los brotes estudiados

Brote	Fecha	Colectivo	Nº de enfermos	Nº de expuestos	Tasa de ataque	Nº de hospitalizados	Tasa de hospitalización	Nº de muestras estudiadas
1	Jun 2003	Guardería	31	126	24,6	0	0	5
2	Jul 2003	Residencia de ancianos	49	92	53,3	1	2,0	3
3	Sep 2003	Guardería	15	64	23,4	3	20,0	3
4	Nov 2003	Residencia de ancianos	81	207	39,1	0	0	4
5	Nov 2003	Residencia de ancianos	105	244	43,0	0	0	19
6	Ene 2004	Residencia de ancianos	113	196	57,7	0	0	2
7	Ene 2004	Residencia de ancianos	14	75	18,7	0	0	4
8	Ene-Feb 2004	Residencia de ancianos	82	700	11,7	0	0	14
9	Ene 2004	Residencia de ancianos	15	35	42,9	1	6,7	3
10	Feb 2004	Colegio	74	263	28,1	0	0	17
11	Feb 2004	Residencia de ancianos	59	386	15,3	0	0	3
12	Feb 2004	Residencia de ancianos	41	191	21,5	0	0	8
13	Mar 2004	Hospital	22	30	73,3	0	0	2
14	Mar 2004	Comedor de empresa	175	1.700	10,3	1	0,6	2
15	Abr 2004	Residencia de ancianos	40	151	26,5	0	0	3
16	May 2004	Colegio	15	46	32,6	0	0	2
17	May 2004	Residencia de ancianos	40	120	33,3	0	0	2
18	Jun 2004	Residencia de ancianos	34	106	32,1	1	2,9	3
19	Jul 2004	Residencia de ancianos	44	93	47,3	0	0	6
20	Ago 2004	Residencia de ancianos	11	93	11,8	0	0	3
21	Sep 2004	Restaurante	100	163	61,3	0	0	2
22	Oct 2004	Residencia de ancianos	22	67	32,8	0	0	2
23	Oct 2004	Residencia de ancianos	62	280	22,1	0	0	11
24	Oct 2004	Residencia de ancianos	60	190	31,6	0	0	5
25	Oct 2004	Centro psiquiátrico	61	177	34,5	0	0	10
26	Oct 2004	Residencia de ancianos	75	373	20,1	0	0	8
27	Oct 2004	Residencia de ancianos	51	345	14,8	0	0	5
28	Oct 2004	Residencia de ancianos	41	124	33,1	0	0	6
29	Nov 2004	Residencia de ancianos	28	60	46,7	0	0	4
30	Dic 2004	Residencia de ancianos	12	110	10,9	0	0	4
<b>Total</b>			<b>1.572</b>	<b>6.807</b>	<b>23,1</b>	<b>7</b>	<b>0,4</b>	<b>165</b>

b) Criterio específico de detección: se consideró brote ante al menos un resultado positivo para NoV en una misma muestra por más de una técnica y más de un resultado positivo para NoV en muestras diferentes correspondientes al mismo brote por más de una técnica. En estas situaciones se estimó que cada técnica de ELISA detectó el brote cuando se obtuvo más de un resultado positivo.

El análisis de sensibilidad y especificidad de las dos técnicas de ELISA se efectuó teniendo en cuenta el número de muestras estudiadas por brote (brotes con 3 o menos muestras y brotes con más de 3 muestras). La asociación entre los resultados aportados por las diferentes técnicas se evaluó con el test de chi cuadrado o prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los valores esperados fueran menores de 5.

## Resultados

Muestras (pacientes): 70 de las 165 muestras resultaron positivas para NoV mediante RT-PCR. IDEIA aportó 31 resultados positivos y RIDASCREEN 39. La sensibilidad y especificidad respecto con RT-PCR en el total de muestras estudiadas fue respectivamente del 47,1% (33/70) y 92,6% (88/95) para RIDASCREEN y del 38,6% (27/70) y del 94,7% (90/95) para IDEIA.

Brotes: El análisis de la utilidad diagnóstica de ambos métodos de ELISA, de acuerdo con los criterios de consenso entre técnicas, reveló que los mejores niveles de eficacia se alcanzaban para RIDASCREEN al emplear como referencia el criterio sensible de consenso (sensibilidad del 94,1% [16/17] y especificidad del 92,3% [12/13]) y para IDEIA el criterio específico (sensibilidad del 80% [8/10] y especificidad del 100% [20/20]). La tabla 2 expone los valores de sensibilidad y especificidad de cada técnica para la detección de brotes por NoV según los criterios de clasificación, basados en el consenso entre técnicas y según el número de muestras estudiadas.

## Discusión

Los miembros del género NoV son virus no cultivables, por lo que su diagnóstico se ha llevado clásicamente a cabo por ME. No obstante, la baja sensibilidad de esta técnica<sup>6</sup> hizo que la ME fuera siendo reemplazada por los procedimientos de genómicos de amplificación de ARN. Sin embargo, estos métodos moleculares suelen quedar fuera del alcance de muchos laboratorios de mi-

TABLA 2. Sensibilidad y especificidad de cada técnica para la detección de brotes por norovirus según los criterios de clasificación basados en el consenso entre técnicas y en función del número de muestras estudiadas

Criterios de consenso en la clasificación del brote por cada técnica	Criterio de detección de brotes	Brotos según n.º de muestras estudiadas
Criterio de consenso sensible de detección de brotes Asumiendo que el brote está causado por norovirus cuando se detecta al menos un resultado positivo para norovirus en una misma muestra por más de una técnica y en alguna otra muestra diferente por al menos una de las tres técnicas	Al menos un resultado positivo	Total de brotes estudiados (n = 30)
		Brotos con $\geq 4$ muestras estudiadas (n = 16)
		Brotos con $\geq 3$ muestras estudiadas (n = 14)
Criterio de consenso específico de detección de brotes Asumiendo que el brote está causado por norovirus cuando se detecta al menos un resultado positivo para norovirus en una misma muestra por más de una técnica y más de un resultado positivo en muestras diferentes correspondientes al mismo brote por más de una técnica	Más de un resultado positivo	Total de brotes estudiados (n = 30)
		Brotos con $\geq 4$ muestras estudiadas (n = 16)
		Brotos con $\leq 3$ muestras estudiadas (n = 14)

Asociación con criterio estándar: \*test de  $\chi^2$ ; \*\*Test exacto de Fisher de dos colas.

crobiología clínica. Recientemente se han desarrollado técnicas de ELISA destinadas al diagnóstico de NoV mediante detección antigénica que han mostrado una sensibilidad intermedia entre la ME y la RT-PCR<sup>6</sup>. Las dos técnicas de ELISA evaluadas en este estudio aportaron una buena especificidad respecto a la RT-PCR para la detección de NoV en muestras aisladas. Sin embargo, su sensibilidad resultó muy pobre, lo que limita su utilidad para el diagnóstico de casos esporádicos. Los resultados obtenidos para la detección de NoV en muestras de heces por IDEIA, en relación con los obtenidos por RT-PCR, están en concordancia con los informados en estudios previos, en los que se reveló una excelente especificidad de entre el 98,3<sup>7</sup> y el 100%<sup>8</sup> con valores de sensibilidad que oscilaron entre el 39<sup>8</sup> y el 55,5%<sup>7</sup>. En el caso de RIDASCREEN, los resultados del presente estudio contrastan con los publicados por otros autores<sup>9</sup>, según los cuales la sensibilidad y especificidad de esta técnica fueron respectivamente del 71 y del 47%. Una posible explicación de esta discrepancia podría radicar en que en ese estudio la comparación de resultados se realizó con RT-PCR y/o ME. Teniendo en cuenta la baja sensibilidad de la ME (23,9% según algunos estudios)<sup>7</sup>, al incluirla como método de referencia quizá se potenciara la aparición de falsos positivos para RIDASCREEN al tiempo que se limitaría la posibilidad de falsos negativos.

Desde un punto de vista epidemiológico resulta más importante el diagnóstico de brotes que el diagnóstico de cada uno de los casos individuales. Generalmente, se considera precisa, para la confirmación de un brote, la identificación de al menos dos resultados positivos en muestras de diferentes pacientes<sup>7</sup>. No obstante, el rango de muestras positivas requeridas para la confirmación de brotes varía en distintos países<sup>10</sup>. En este trabajo para la evaluación de las técnicas de ELISA se aplicaron en la definición de brotes dos criterios de consenso entre técnicas (incluyendo RT-PCR y los dos ELISA). Teniendo en

cuenta estos criterios, y evaluando el número de muestras positivas por ELISA, se observó que, asumiendo el primer criterio de consenso para la definición de brote, la sensibilidad y especificidad de RIDASCREEN basadas en la identificación de al menos un caso se situó por encima del 90%. Siguiendo el criterio más específico de consenso, la detección de más de un resultado positivo por IDEIA aportó una excelente especificidad (100%) y una sensibilidad del 80%. Estos resultados sugieren una mejor sensibilidad de las dos técnicas de ELISA que la que se aprecia empleando únicamente la RT-PCR como referencia. Estas técnicas quizá podrían resultar útiles para la detección de brotes por norovirus en laboratorios que carezcan de técnicas moleculares.

#### Agradecimientos

Al Servicio de Epidemiología y a las Secciones de Epidemiología de Las Áreas de Sanitarias del Instituto de Salud Pública de la Comunidad de Madrid por la investigación de los brotes estudiados.

#### Bibliografía

- Sala MR, Cardeñosa N, Arias C, Llovet T, Recasens A, Domínguez A, et al. An outbreak of food poisoning due to a genogroup I norovirus. *Epidemiol Infect.* 2005;133:187-91.
- Godoy P, Izcarra J, Bartolomé R, Bach P, Escobar A, Pal M, et al. Toxiinfección alimentaria por Norovirus debida al consumo de bocadillos. *Med Clin (Barc).* 2005;124:161-4.
- Navarro G, Sala RM, Segura F, Arias C, Antón E, Varela P, et al. An outbreak of norovirus infection in a long-term-care unit in Spain. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;26:259-62.
- Almagro-Nieves D, Guisosa-Campos P, Garrido-Almagro S, García-Aragón MA. Brote epidémico de gastroenteritis aguda por norovirus con posible origen hídrico. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:93-5.
- Sánchez-Fauquier A, Wilhelmi I, Román E, Colomina J, Montero V, Negro A. Surveillance of human calicivirus in Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:1327-9.

RIDASCREEN			IDEIA		
Sensibilidad	Especificidad de consenso	Asociación con criterio	Sensibilidad	Especificidad de consenso	Asociación con criterio
94,1% (16/17)	92,3% (12/13)	p < 0,01*	82,4% (14/17)	84,6% (11/13)	p < 0,01*
100% (8/8)	100% (8/8)	p < 0,01**	87,5% (7/8)	100% (8/8)	p < 0,01**
88,9% (8/9)	80% (4/5)	p < 0,05**	77,8% (7/9)	60% (3/5)	NS
80% (8/10)	90% (18/20)	p < 0,01**	80% (8/10)	100% (20/20)	p < 0,01**
100% (7/7)	100% (9/9)	p < 0,01**	71,4% (5/7)	100% 9/9	p < 0,01**
33,3% (1/3)	81,8% (9/11)	NS	100% (3/3)	100% (11/11)	p < 0,01**

6. Parashar U, Quiroz ES, Mounts AW, Monroe SS, Fankhauser RL, Ando T, et al. "Norwalk-like viruses". Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep.* 2001;50:1-17.
7. Richards AF, Lopman B, Gunn A, Curry A, Ellis D, Cotterill H, et al. Evaluation of a commercial ELISA for detecting Norwalk-like virus antigen in faeces. *J Clin Virol.* 2003;26:109-15.
8. Burton-MacLeod JA, Kane EM, Beard RS, Hadley LA, Glass RI, Ando T. Evaluation and comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of antigenically diverse human noroviruses in stool samples. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2587-95.
9. Dimitriadis A, Marshall JA. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay for detection of norovirus in outbreak specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:615-8.
10. Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:90-6.