

## RIDA® GENE Norovirus I & II

**REF** PG1415



## 1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Norovirus I & II es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa y la diferenciación de norovirus (genogrupos I y II) en muestras de heces humanas.<sup>1,2</sup>

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II está concebido como una ayuda para el diagnóstico de gastroenteritis causada por norovirus.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

Los norovirus son, con diferencia, la causa de la mayoría de los brotes de gastroenteritis no bacteriana.<sup>3,4,5</sup> Una gastroenteritis causada por norovirus se manifiesta por náuseas, vómitos y diarrea importantes. Los norovirus se expulsan en las heces y los vómitos. La transmisión aérea a través de los aerosoles que contienen el virus es con frecuencia la causa de una difusión muy rápida en lugares compartidos.<sup>6,7,8</sup> Los CDC de EE. UU. calculan que más de 21 millones de casos de gastroenteritis aguda, 70 000 hospitalizaciones y 800 muertes se deben cada año a infecciones por norovirus en Estados Unidos.<sup>9</sup>

Los norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae*. Debido a su morfología (virus redondos estructurados pequeños [SRSV]), pueden distinguirse de los calicivirus tradicionales. Los SRSV deben su nombre al lugar donde se aislaron por primera vez. El nombre «tipo Norwalk» se mantuvo para todos los virus aislados durante brotes de gastroenteritis. El nombre se originó del primer SRSV aislado en la ciudad de Norwalk, Ohio, EE. UU. en 1972. Posteriormente, se designó de manera similar a otros aislados, como el agente de Snow Mountain, el agente de Hawaii y el agente de Montgomery County. Los norovirus son virus pequeños, sin envoltura, con ARN monocatenario (ARNmc). Actualmente, se pueden agrupar en 7 genogrupos con más de 30 genotipos y multitud de subtipos («clades»). Hasta el momento, solo se han descrito patógenos humanos del genogrupo I (GI) con 9 genotipos, del genogrupo II (GII) con 22 genotipos y del genogrupo IV (GIV) con dos genotipos.<sup>10,11</sup>

### 3. Principio del ensayo

La RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II es un ensayo de diagnóstico molecular para la diferenciación y la detección cualitativa directa de ARN de norovirus de los genogrupos GI y GII en muestras de heces humanas. La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa va seguida de la PCR en el mismo tubo de reacción. El ARN aislado se transcribe en ADNc por la acción de la transcriptasa inversa. Después, los fragmentos génicos específicos de norovirus GI y GII se amplifican por PCR en tiempo real. Las dianas amplificadas (región de unión ORF1/ORF2) se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Norovirus I & II contiene un **Internal Control RNA** (ICR) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

### 4. Reactivos suministrados

**Tabla 1:** Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarillo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rojo
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	café
N	No Template Control	1x	450 µl	blanco
P	Control positivo	1x	200 µl	azul

### 5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a entre 2 °C y 8 °C).

- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte a la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente separar en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (2 °C a 8 °C).

## 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

**Tabla 2:** Equipo necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS® easyMAG®
Roche	MagNA Pure
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

**Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).**

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en [mdx@r-biopharm.de](mailto:mdx@r-biopharm.de).

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrífuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador de vórtex
- Pipetas (0.5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

## 7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas.
- Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución de la prueba.
- No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.
- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Obtención y almacenamiento de muestras

### 8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ARN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de extracción de ARN (p. ej. RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell® RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ARN viral siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:10 con agua antes de la extracción. Mezcle la muestra en un agitador de vórtex a alta velocidad y centrifúguela a 13,000 x g durante 1 min. Use el volumen de sobrenadante adecuado, según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Norovirus I & II contiene un **Internal Control RNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitorea la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control RNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR, o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 20 µl de **Internal Control RNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control RNA** debe agregarse siempre a la mezcla de la solución amortiguadora de lisado de muestras, y **no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo deben incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3, 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (2 °C a 8 °C) durante la etapa de trabajo.

**Tabla 3:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	<b>Reaction Mix</b>	19.3 µl	212.3 µl
2	<b>Enzyme Mix</b>	0.7 µl	7.7 µl
	<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

**Tabla 4:** Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR como control de inhibición de la PCR únicamente)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	<b>Total</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

## 9.2 Preparación de la mezcla para RT-PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

**Control negativo:** Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control negativo.

**Muestras:** Agregue 5 µl de extracto de ARN a la mezcla maestra prepipeteada.

**Control positivo:** Agregue 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

**Nota:** Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de RT-PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5, 6).

## 9.3 Configuración del equipo de PCR

### 9.3.1 Perfil universal de RT-PCR en tiempo real

**Tabla 5:** Perfil universal de RT-PCR en tiempo real en el equipo serie LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

**Tabla 6:** Perfil universal de RT-PCR en tiempo real de Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u> Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	máxima

**Nota:** La hibridación y la extensión se llevan a cabo en la misma etapa.

**Nota:** El perfil universal de la PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de PCR en tiempo real de ADN RIDA®GENE y de ARN RIDA®GENE.

## 9.4 Configuración del canal de detección

**Tabla 7:** Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 480II	Norovirus GGII	465/510	Se requiere el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
	Norovirus GGI	618/660	
ABI7500	Norovirus GGII	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICR	VIC	
	Norovirus GGI	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus GGII	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno).
	ICR	HEX	
	Norovirus GGI	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus GGII	Verde	La ganancia debe configurarse en 5
	ICR	Amarillo	
	Norovirus GGI	Rojo	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus GGII	FAM	-
	ICR	VIC	
	Norovirus GGI	Cy5	

## 10. Control de calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real usado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8, figuras 1 y 2) para determinar una corrida válida.

El **Positive Control** tiene una concentración de  $10^3$  copias/ $\mu$ l. En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de  $5 \times 10^3$  copias.

**Tabla 8:** Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICR	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND *1	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

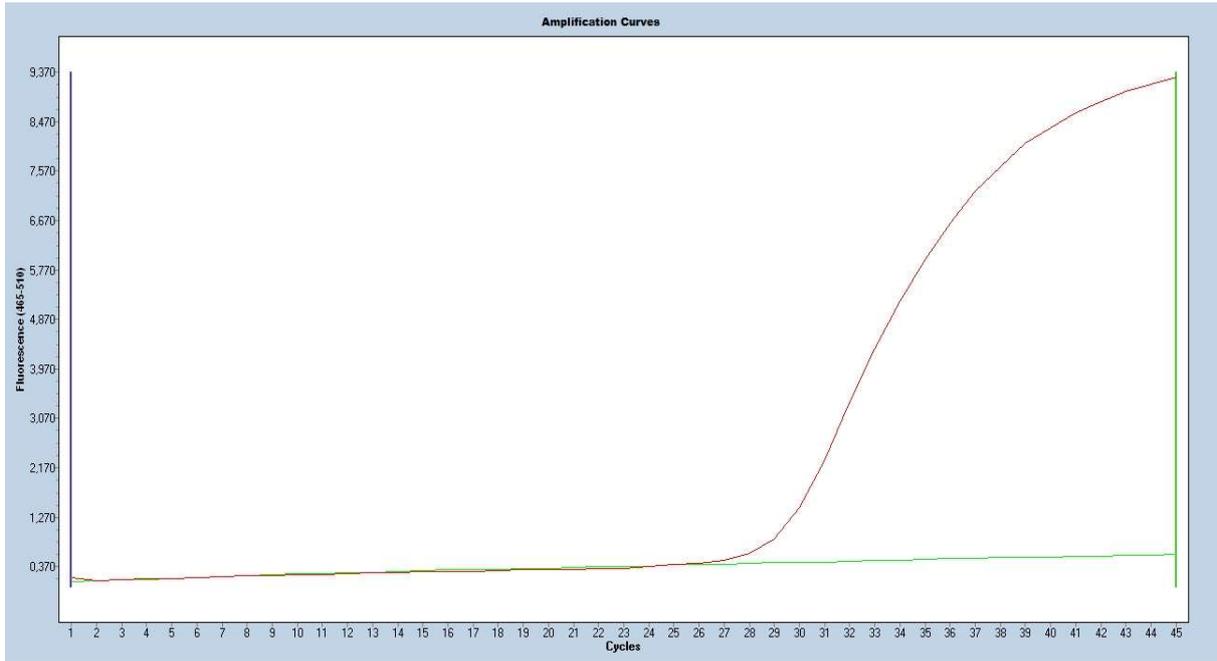
*\*1 No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.*

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

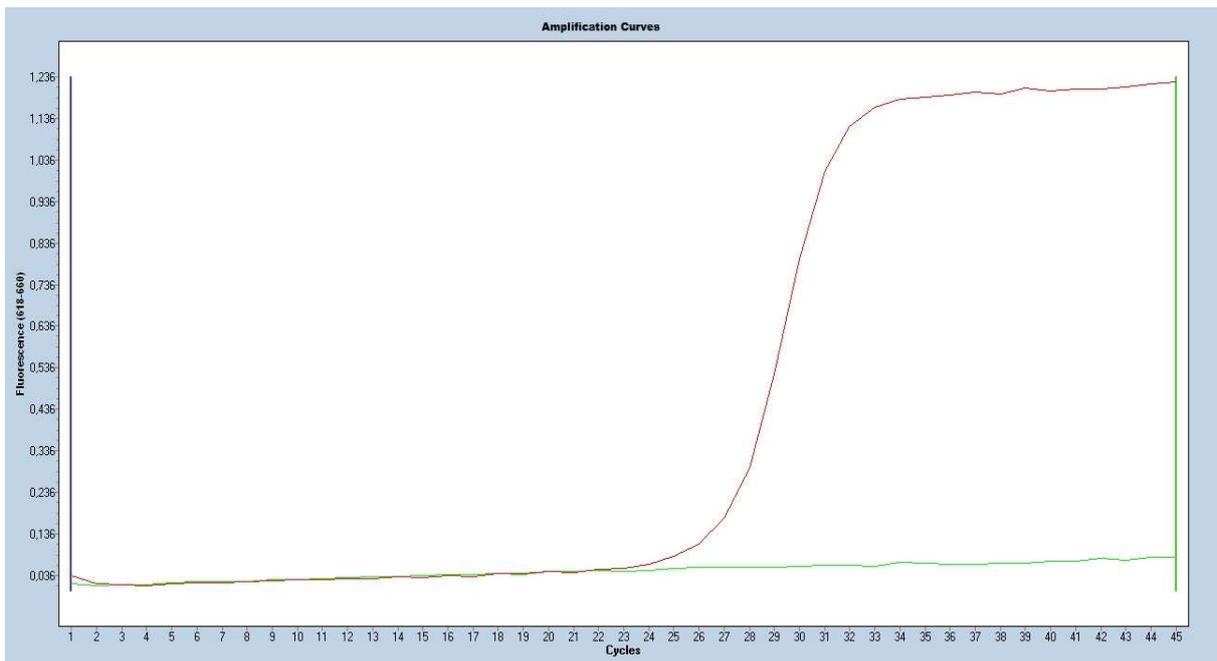
Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba



**Fig. 1:** Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (Norovirus GII) en el LightCycler® 480II



**Fig. 2:** Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (Norovirus GI) en el LightCycler® 480II

## 11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

**Tabla 9:** Interpretación de las muestras

Detección			
Norovirus GII	Norovirus GI	ICR	Resultado
positivo	negativo	negativo/positivo	Norovirus GII detectado
negativo	positivo	negativo/positivo	Norovirus GI detectado
positivo	positivo	negativo/positivo	Norovirus GII y Norovirus GI detectados
negativo	negativo	positivo	Genes diana no detectados
negativo	negativo	negativo	No válido

Se determina que una muestra es positiva si, tanto el ARN de la muestra como el Internal Control RNA muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se considera positiva si hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero no del Internal Control RNA en el sistema de detección. La detección del Internal Control RNA no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal del Internal Control RNA sea débil o esté ausente.

La muestra se considera negativa si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero hay señal de amplificación del Internal Control RNA en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR se puede excluir por la detección del Internal Control RNA.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra y del Internal Control RNA en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir aún más la muestra extraída con agua para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

## 12. Limitaciones del método

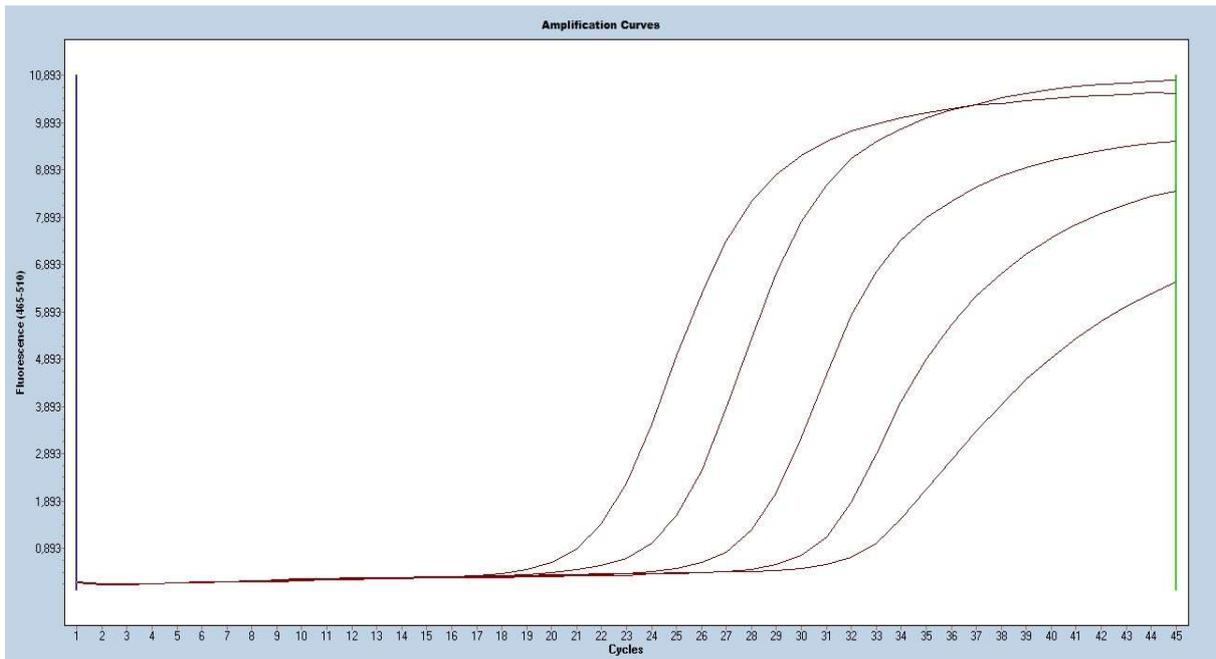
1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga viral en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar a la detección de nuevos genotipos de norovirus, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA®GENE Norovirus I & II.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR in vitro, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (región de unión ORF1/ORF2).
8. El norovirus genogrupo IV, que rara vez infecta a los seres humanos (consulte la tabla 11), también se detecta con el ensayo RIDA®GENE Norovirus I & II.

## 13. Características de rendimiento

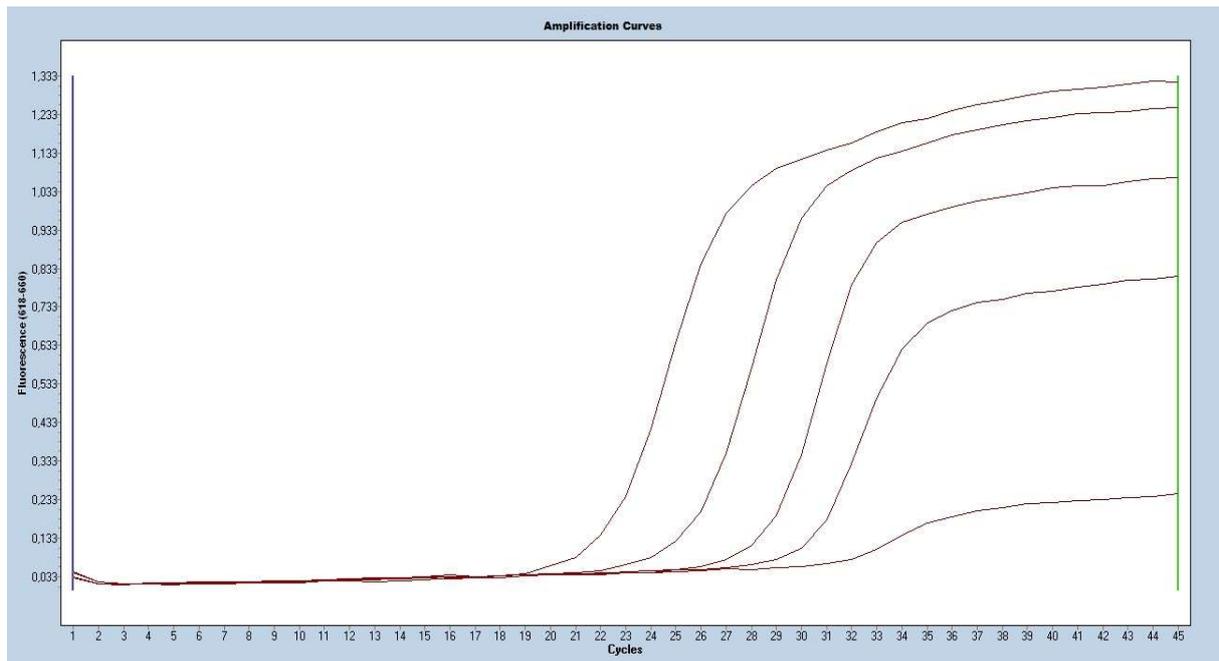
### 13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II tiene un límite de detección  $\geq 50$  copias de ARN por reacción.

Las siguientes figuras 3 y 4 muestran una dilución seriada de norovirus GI y GII ( $5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$  copias de ARN/ $\mu$ l) en el LightCycler® 480II.



**Fig. 3:** Dilución seriada de norovirus GII ( $5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$  copias de ARN/ $\mu$ l) en el LightCycler® 480II



**Fig. 4:** Dilución seriada de norovirus GI ( $5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$  copias de ARN/ $\mu$ l) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ARN y la concentración del ARN.

## 13.2 Especificidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II es específico para norovirus de los genogrupos I y II en muestras de heces humanas. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 10):

**Tabla 10:** Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	Rotavirus	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter lari</i> subespecie <i>lari</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

### 13.3 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II se evaluó en comparación con varios genotipos de norovirus de los genogrupos I, II y IV (consulte la tabla 11). El ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE Norovirus I & II detectó todos los genotipos de norovirus del panel.

**Tabla 11:** Pruebas de reactividad analítica

Norovirus, genogrupo I					
GGI.1 – Norwalk	+	GGI.3 – Desert Shield, Birmingham	+	GGI.6 – Hesse	+
GGI.2 – Southampton, Whiterose	+	GGI.4 – Chiba, Malta	+	GGI.7 – Winchester	+
GGI.2 – Southampton, Southampton	+	GGI.5 – Musgrove	+	GGI.8 – Boxer	+
Norovirus, genogrupo II					
GGII.1 – Hawaii	+	GGII.4 – Sydney 2012	+	GGII.10 – Erfurt	+
GGII.2 – Melksham	+	GGII.6 – Seacroft	+	GGII.b – Hilversum	+
GGII.3 – Toronto	+	GGII.7 – Leeds	+	GII.c – La Haya	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+				
Norovirus, genogrupo IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				

## 14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-07-07	Versión anterior
2021-01-28	Revisión general 10. Control de calidad (Error ortográfico) 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

## 15. Explicación de los símbolos

### Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Obsérvese las instrucciones de uso.*
	Número de lote
	Caducidad
	Almacene a
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

### Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

## 16. Bibliografía

1. Hoehne M and Schreier E. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:69-75.
2. Dreier J, *et al*. Enhanced Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Norovirus Genogroup I. *J Clin Microbiol* 2006; 44(8):2714-2720.
3. Mead PS, *et al*. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999; 5:607-625.
4. Glass RJ, *et al*. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl 2):S254-261.
5. Evan HS, General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996. *Commun Dis Public Health* 1:165-171.
6. Johnston CP, *et al*. Outbreak management and implications of a nosocomial Norovirus outbreak. *CID* 2007; 45:534-540.
7. Corwin AL, *et al*. Shipboard impact of a probable Norwalk virus outbreak from coastal Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61(6):898-903.
8. Kaplan JE, *et al*. An outbreak of acute nonbacterial gastroenteritis in a nursing home: demonstration of person-to-person transmission by temporal clustering of cases. *Am J Epidemiol* 1982; 116:940-948.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Norovirus: Overview 2012.
10. Parra GI, *et al*. Static and Evolving Norovirus Genotypes: Implications for Epidemiology and Immunity. *PLoS Pathog* 2017; 13(1): e1006136.
11. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J. Clin. Microbiol* 2015;53(2):373-81