RIDA®GENE Norovirus I & II

REF PG1415

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

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*. RIDA®GENE Norovirus I & II è un test RT-PCR real time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di Norovirus (genogruppo I e II) in campioni di feci umane.[1,2]

RIDA®GENE Norovirus I & II RT-PCR real time multiplex è adatto come ausilio nella diagnosi di gastroenterite causata dai Norovirus.

2. Sintesi e spiegazione del test

I Norovirus sono la principale causa della maggior parte dei focolai di gastroenterite non batterica.[3,4,5] Una gastroenterite causata da Norovirus si manifesta con nausea, vomito e diarrea. I Norovirus sono escreti nelle feci e con il vomito. La trasmissione aerogena attraverso aerosol infetti è spesso la causa della rapidissima diffusione di questi virus nei servizi in comune.[6,7,8] Il CDC stima che ogni anno negli Stati Uniti oltre 21 milioni di casi di gastroenterite acuta, 70.000 ricoveri e 800 decessi sono provocati da infezioni da Norovirus.[9]
I Norovirus appartengono alla famiglia dei *Caliciviridae*. Si differenziano dai Calicivirus tradizionali per via della loro morfologia (SRSV - Small Round Structured Virus SRSV). Gli SRSV sono stati nominati in funzione del luogo in cui è avvenuto il loro isolamento. Il nome "virus di Norwalk", ad esempio, indicava tutti i virus isolati durante le epidemie di gastroenterite ed ebbe origine in occasione del primo isolamento di SRSV, avvenuto nel 1972 nella città di Norwalk, Ohio, Stati Uniti. Più tardi, altri isolati, tra cui il patogeno Snow Mountain, il patogeno Hawaii e il Montgomery County, sono stati nominati in virtù dello stesso principio. I Norovirus sono virus piccoli e senza involucro, a singolo filamento di RNA (ssRNA). Possono essere raggruppati in 7 genogruppi, che attualmente contano 30 genotipi e numerosi cladi. Finora, gli agenti patogeni umani sono stati descritti solo come appartenenti al genogruppo I (GI), con 9 genotipi, al genogruppo II (GII), con 22 genotipi e al genogruppo IV (GIV), con due genotipi.[10,11]

3. Principio del test

Il test RT-PCR real time multiplex RIDA®GENE Norovirus I & II è un test diagnostico molecolare per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione di RNA di Norovirus del genogruppo GI e RNA di Norovirus del genogruppo GII in campioni di feci umane. La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase, durante la quale la PCR segue la trascrizione inversa nella stessa provetta di reazione. L'RNA isolato viene trascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa. I frammenti genetici specifici di Norovirus GI e GII vengono successivamente amplificati mediante PCR real time. I target amplificati (regione della giunzione ORF1/ORF2) vengono rivelati con sonde ad idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la Taq-Polymerase rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Norovirus I & II contiene un Internal Control RNA (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrone
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).

- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelamento senza compromettere le prestazioni (ad esempio dopo il primo scongelamento, separare il reagente in aliquote e congelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RIDA®GENE Norovirus I & II RT-PCR real time multiplex è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real time elencati di seguito:

Tab. 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS® easyMAG®
Roche	MagNA Pure
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Avvertenze: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler® 480II
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.
- Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test.
- Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose.
- Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test.
- Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.
- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento dell'RNA da campioni di feci umane, utilizzare un kit di estrazione dell'RNA disponibile in commercio (ad es. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione dell'RNA (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre l'RNA virale in base alle istruzioni del produttore.
Prima dell'estrazione, si raccomanda di diluire il campione di feci con acqua in rapporto 1:10. Vorticare vigorosamente e centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il kit RIDA®GENE Norovirus I & II contiene un Internal Control RNA che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L'Internal Control RNA può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l'Internal Control RNA viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di Internal Control RNA alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l'Internal Control RNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione **e** come controllo di inibizione della PCR, aggiungere

20 µl di Internal Control RNA durante la procedura di estrazione.
L'Internal Control RNA deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente al campione. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di Internal Control RNA alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la Reaction Mix, l'Enzyme Mix, il Positive Control, il No Template Control e l'Internal Control RNA. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2 - 8 °C).

Tab. 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR come controllo di estrazione e inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	**20 µl**	**220 µl**

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tab. 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
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
	Totale	**21,0 µl**	**231,0 µl**

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della mix per RT-PCR

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di No Template Control nella Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: **se l'Internal Control RNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di Internal Control RNA alla RT-PCR Mix del controllo negativo.**

Campioni: dispensare 5 µl di RNA Extract nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di Positive Control alla Master Mix pre-pipettata.

Avvertenze: **se l'Internal Control RNA viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di Internal Control RNA alla RT-PCR Mix del controllo positivo.**

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real-time. La reazione RT-PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

Tab. 5: Profilo universale RT-PCR real-time per la serie LightCycler®

Trascrizione inversa Denaturazione iniziale	10 min, 58 °C 1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione Appaiamento/Estensione	10 s, 95 °C 15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo universale RT-PCR per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

Trascrizione inversa Denaturazione iniziale	10 min, 58 °C 1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
PCR Denaturazione Appaiamento/Estensione	15 s, 95 °C 30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Avvertenze: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Avvertenze: il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time del DNA RIDA®GENE e dell'RNA RIDA®GENE vengono combinati in un unico ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Avvertenze
Roche LightCycler® 480II	Norovirus GGII	465/510	**RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessario**
	ICR	533/580	
	Norovirus GGI	618/660	
ABI7500	Norovirus GGII	FAM	**Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno**
	ICR	VIC	
	Norovirus GGI	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus GGII	FAM	**Controllare che non vi sia colorante di riferimento**
	ICR	HEX	
	Norovirus GGI	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus GGII	Verde	**Le impostazioni di amplificazione (gain) devono essere regolate su 5**
	ICR	Giallo	
	Norovirus GGI	Rosso	
Bio-Rad CFX96™	Norovirus GGII	FAM	-
	ICR	VIC	
	Norovirus GGI	Cy5	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, occorre che il controllo negativo e il controllo positivo mostrino risultati corretti (vedere Tabella 8, Fig. 1, Fig. 2).

Il Positive Control ha una concentrazione di 10^3 copie/µl. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5 x 10^3 copie.

Tab. 8: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICR	Ct Target
Controllo positivo	Positivo	NA *[1]	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

[1] Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

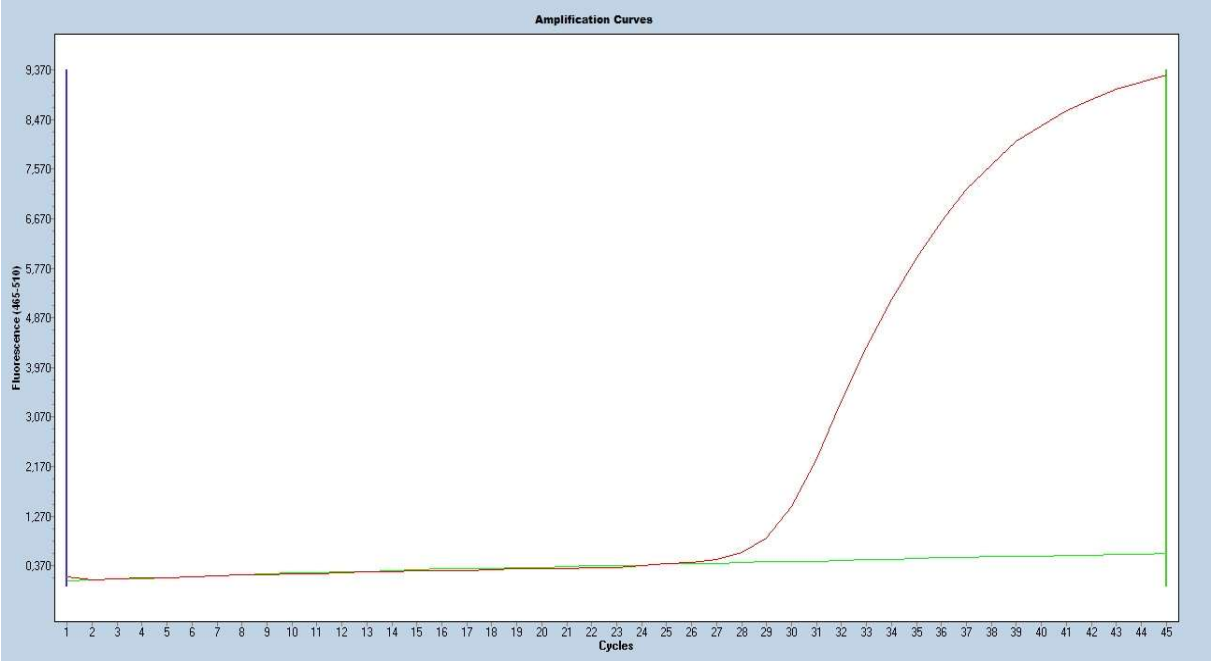

Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Norovirus GII) sul LightCycler® 480II

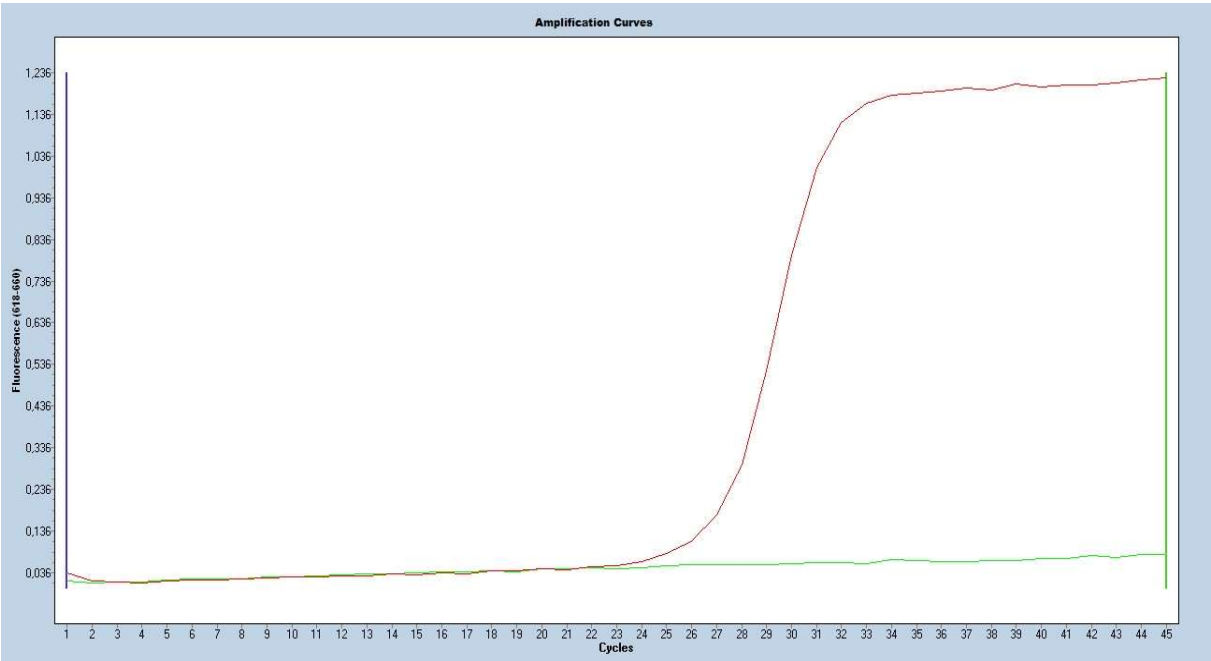

Fig. 2: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Norovirus GI) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tab.9: Interpretazione del campione

Rivelazione			
Norovirus GII	**Norovirus GI**	**ICR**	**Risultato**
positivo	negativo	**negativo/positivo**	**Norovirus GII rivelato**
negativo	**positivo**	**negativo/positivo**	**Norovirus GI rivelato**
positivo	**positivo**	**negativo/positivo**	**Norovirus GII e Norovirus GI rivelati**
negativo	negativo	**positivo**	**Geni target non rilevati**
negativo	negativo	negativo	**Non valido**

Un campione è valutato come positivo se sia l'RNA del campione sia l'Internal Control RNA mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è valutato come positivo anche se l'RNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'Internal Control RNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'Internal Control RNA non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'Internal Control RNA sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale di amplificazione per l'Internal Control RNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'Internal Control RNA esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'Internal Control RNA mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti virali nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre risultati falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rivelazione di nuovi genotipi di Norovirus con il test RIDA®GENE Norovirus I & II e causare un falso negativo.
6. Come per tutti i test diagnostici in vitro basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (regione della giunzione ORF1/ORF2).
8. Anche i Norovirus del genogruppo IV, che molto raramente infettano gli esseri umani, (vedere Tab. 11), possono essere rivelati dal test RIDA®GENE Norovirus I & II.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA®GENE Norovirus I & II RT-PCR real time multiplex ha un limite di rivelazione di ≥ 50 copie di RNA per reazione.

Le figure 3 e 4 seguenti mostrano una serie di diluizioni di Norovirus GI e GII (5×10^5 – 5×10^1 copie di RNA per µl) sul LightCycler® 480II.

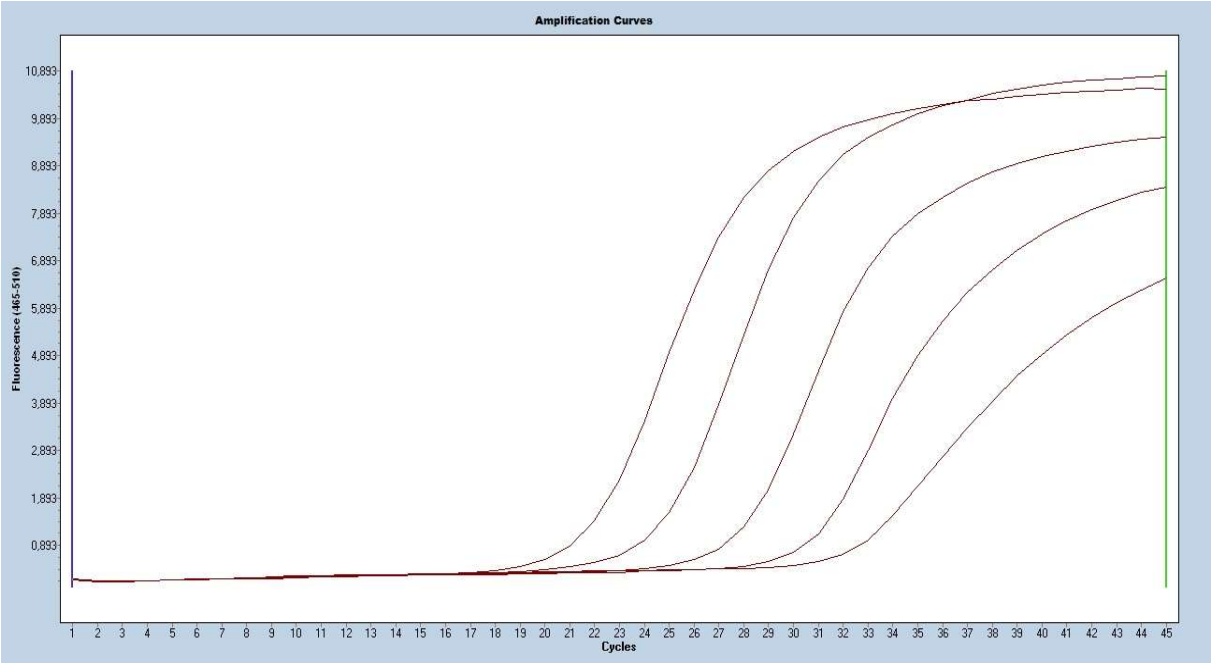

Fig. 3: Serie di diluizioni di Norovirus GII (5×10^5 – 5×10^1 copie di RNA per µl) sul LightCycler® 480II

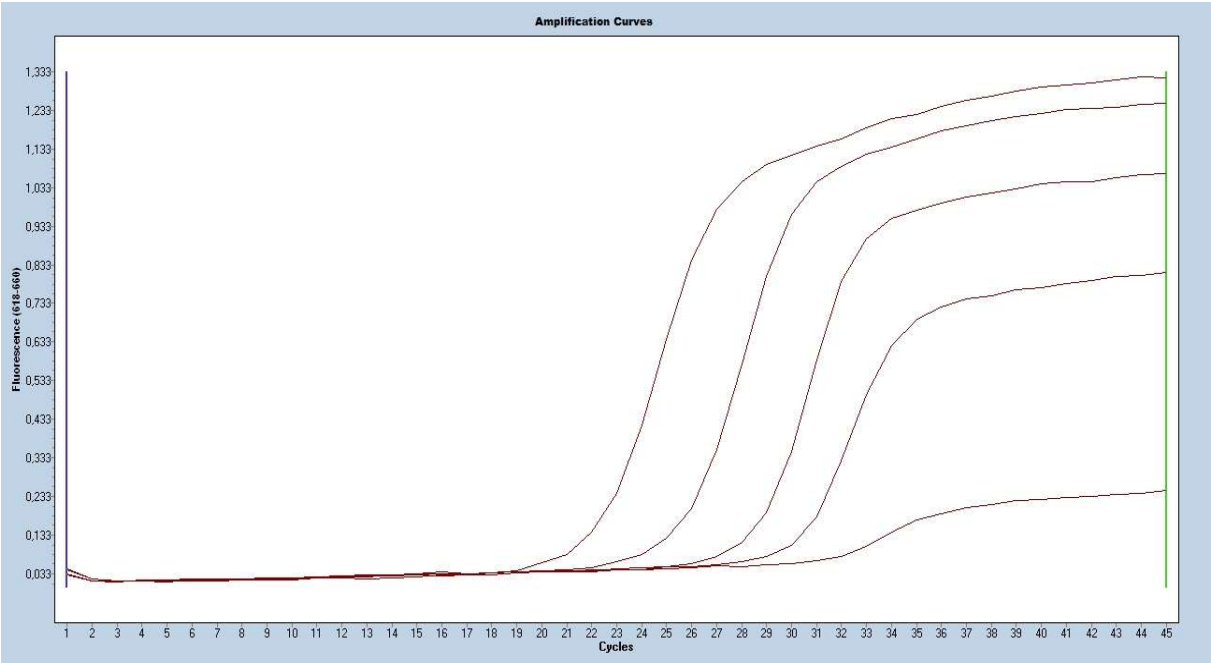

Fig. 4: Serie di diluizioni di Norovirus GI (5×10^5 – 5×10^1 copie di RNA per µl) sul LightCycler® 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione dell'RNA e dalla concentrazione di RNA.

13.2 Specificità analitica

RIDA®GENE Norovirus I & II RT-PCR real time multiplex è specifico per Norovirus dei genogruppi I e II in campioni di feci umane. Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 10):

Tab. 10: Test di reattività crociata

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

13.3 Reattività analitica

La reattività di RIDA®GENE Norovirus I & II RT-PCR real time multiplex è stata valutata rispetto a più genotipi dei genogruppi I, II e IV di Norovirus (vedere Tab. 11). Tutti i genotipi di Norovirus del panel sono stati rivelati da RIDA®GENE Norovirus I & II real-time RT-PCR.

Tab. 11: Test di reattività analitica

Norovirus genogruppo 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 genogruppo 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 – Den Haag	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+				
Norovirus genogruppo IV					
GGIV.1 – Alphatron	+				

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-07-07	Versione precedente
2021-01-28	Revisione generale 10. Controllo qualità (errore d'ortografia) 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

IVD	Diagnostica *in vitro*
	Leggere il foglio illustrativo
LOT	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
REF	Numero articolo
Σ	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografia

1. Hoehne M and Schreier E. Detection if 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):373-8