



RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405



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



1. Application

Pour le diagnostic *In-vitro*. Le test RIDA®GENE Norovirus est un test de RT-PCR en temps réel pour la détection qualitative directe des norovirus (génogroupes I et II) dans les échantillons de selles humaines^{1,2}.

Le test de RT-PCR en temps réel RIDA®GENE Norovirus est destiné à faciliter le diagnostic de la gastroentérite provoquée par des norovirus.

2. Résumé et explication du test

Les norovirus sont de loin les agents infectieux qui provoquent le plus grand nombre d'épidémies de gastroentérite non bactérienne^{3,4,5}. Une gastroentérite causée par norovirus se manifeste par de sévères nausées, des vomissements et de la diarrhée. Les norovirus sont expulsés dans les selles et les vomissements. La maladie se propage souvent très rapidement dans les établissements collectifs du fait de la transmission aérienne d'aérosols contenant le virus^{6,7,8}. Le CDC estime que, chaque année, plus de 21 millions de cas de gastroentérite aiguë, 70 000 hospitalisations et 800 décès sont provoqués par des infections à norovirus aux États-Unis⁹.

Les norovirus appartiennent à la famille des *Caliciviridae*. Leur morphologie (petits virus structurés ronds [SRSV]) permet de les distinguer des calicivirus traditionnels. Les SRSV ont été nommés d'après le lieu où ils ont été isolés. Ainsi, le nom de « de type Norwalk » s'appliquait à tous les virus isolés pendant des épidémies de gastroentérite. Le nom découle du lieu de l'isolation du premier SRSV, à savoir la ville de Norwalk dans l'Ohio, aux États-Unis, en 1972. Plus tard, d'autres isolats comme l'agent de Snow Mountain, l'agent de Hawaii et l'agent de Montgomery County ont été nommés d'une manière similaire. Les norovirus sont de petits virus sans enveloppe dotés d'un ARN à simple brin (ARNsb). Ils peuvent être regroupés en 7 génogroupes comptant actuellement plus de 30 génotypes et de nombreux clades. À ce jour, les agents pathogènes pour l'homme appartiennent uniquement au génogroupe I (GI) qui compte 9 génotypes, au génogroupe II (GII) qui compte 22 génotypes et au génogroupe IV (GIV) qui compte deux génotypes^{10,11}.

3. Principe du test

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Norovirus est un test de diagnostic moléculaire pour la détection qualitative directe de l'ARN de norovirus (génogroupes GI et GII) dans les échantillons de selles humaines. La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape où la transcription inverse est suivie de la PCR dans le même tube de réaction. L'ARN isolé est transcrit en ADNc par une transcriptase inverse. Les fragments de gènes spécifiques aux norovirus GI et GII sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel. Les cibles amplifiées (région de jonction ORF1/ORF2) sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons. Pendant l'étape d'extension, la Taq-Polymerase rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA®GENE Norovirus contient un Internal Control RNA (ICR) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couvercle
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rouge
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brun
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).

- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de RT-PCR en temps réel RIDA®GENE Norovirus peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2: Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Qiagen	QIAasymphony SP/AS
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque: utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 480II
- Kit de compensation de couleur RIDA®GENE II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables sans poudre
- Eau de PCR (qualité BioScience, sans nucléase, eau traitée au DEPC)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

- Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.
- Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ARN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ARN (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ARN (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ARN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer l'échantillon de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/10. Agiter fortement l'échantillon et le centrifuger à 13 000 x g pendant 1 min. Utiliser un volume adéquat de surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Norovirus inclut un ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control RNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et le **Internal Control RNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3: Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICR comme contrôle de l'extraction et de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4: Calcul et exemple de pipetage pour 10 réactions du mélange maître (ICR uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la RT-PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif: Ajouter 5 µl de **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'extrait d'ARN au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de RT-PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

Tableau 5: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque: l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.

Tableau 6: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque: l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape

Remarque: Le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel ADN RIDA®GENE et ARN RIDA®GENE sont combinés dans un même test.

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	Norovirus	530	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) est nécessaire
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	Le RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) est nécessaire
	ICR	533/580	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICR	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Vérifier que le colorant de référence n'est pas précisé
	ICR	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5
	ICR	Jaune	
Bio-Rad CFX 96™	Norovirus	FAM	
	ICR	VIC	

Remarque: lors de l'utilisation du LightCycler® 2.0, le paramètre « Seek Temperature » doit être augmenté de « 30 » à « 58 ».

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 8, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μ l. Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 8: Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites:

Échantillon	Résultat du test	Ct ICR	Ct cible
Positive control	Positif	S/O *1	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

**1 Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.*

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfaits, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test:

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

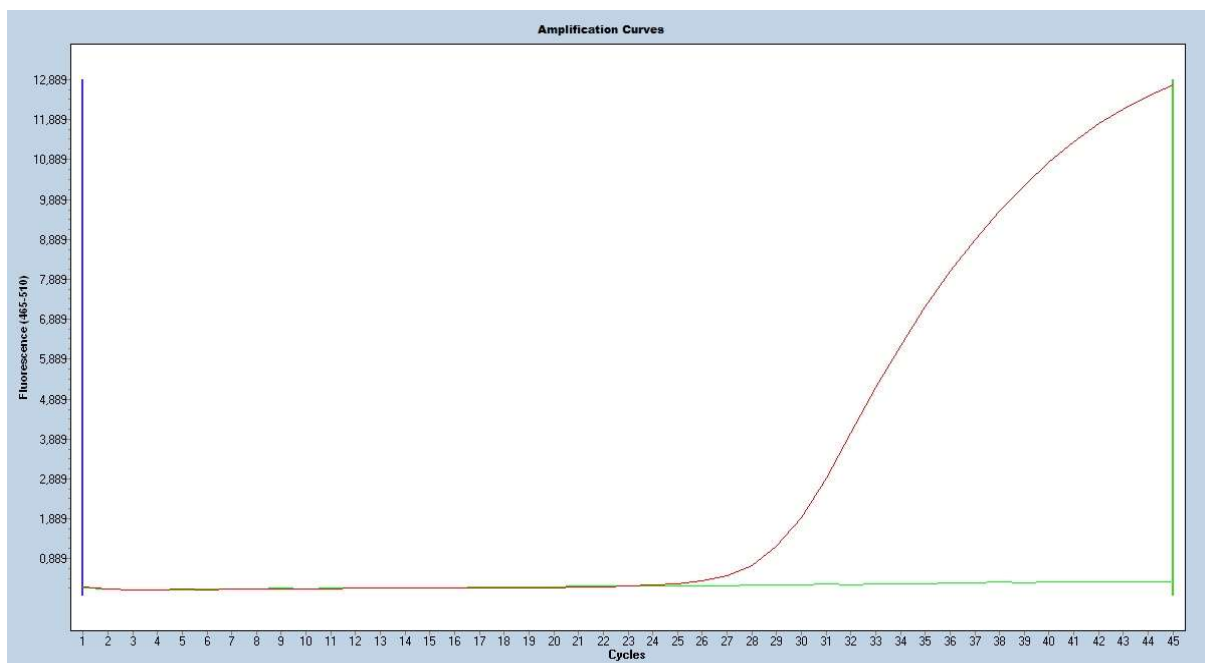


Figure 1: Exécution correcte des contrôles positif et négatif (norovirus) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Norovirus	ICR	Résultat
positif	positif/négatif	Norovirus détecté
négatif	positif	Norovirus non détecté
négatif	négatif	Non valide

Norovirus est détecté si l'ARN de l'échantillon et le **Internal Control RNA** présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Norovirus est également détecté si l'ARN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le **Internal Control RNA**. La détection du **Internal Control RNA** n'est pas nécessaire car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du **Internal Control RNA**.

Norovirus n'est pas détecté si l'ARN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le **Internal Control RNA**. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA**.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge virale inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux génotypes de Norovirus et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®]GENE Norovirus.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDD) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible (région de jonction ORF1/ORF2).
8. Le génogroupe IV de norovirus, qui infecte très rarement l'homme (voir tableau 11), est aussi détecté par le test RIDA[®]GENE Norovirus.

13. Performances

13.1 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE Norovirus est ≥ 50 copies d'ARN par réaction (voir figure 2).

Les figures 2 et 3 ci-dessous présentent une série de dilutions des norovirus GI et GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler[®] 480II.

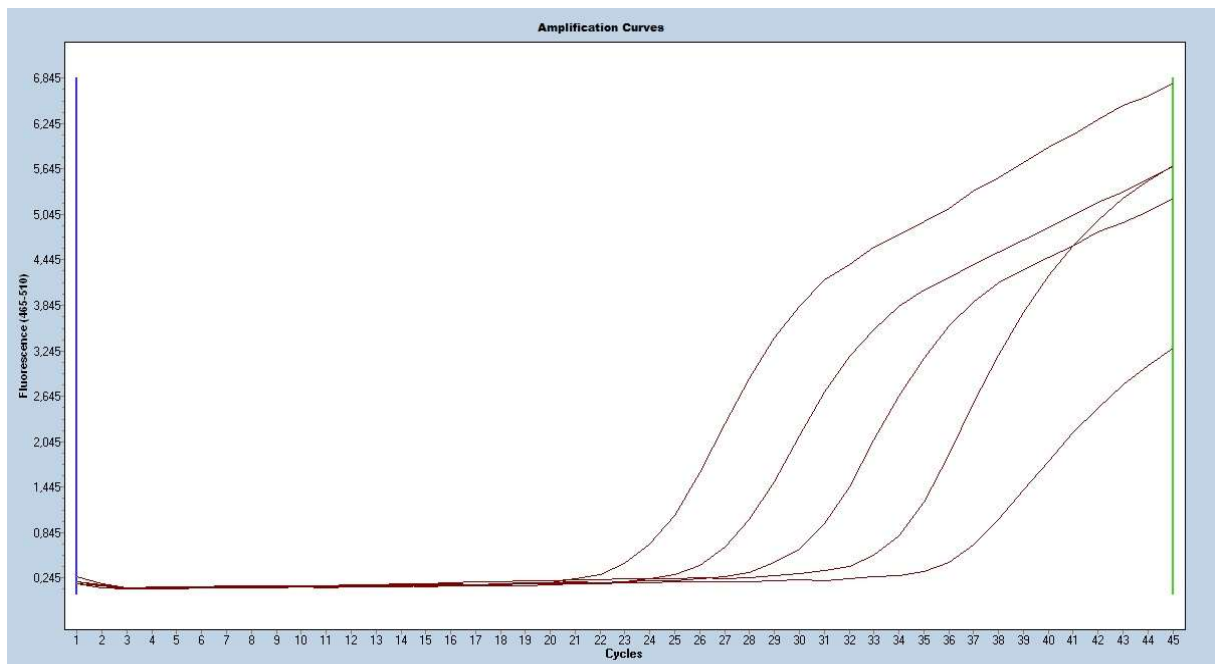


Figure 2: Série de dilutions de norovirus GI ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

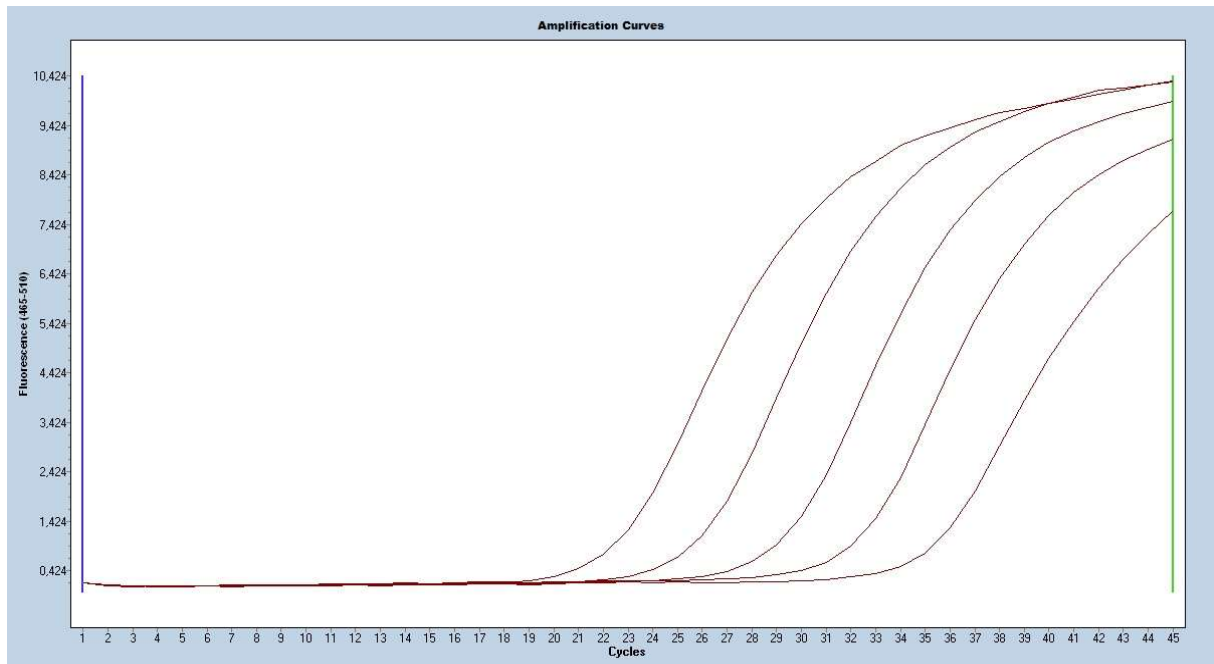


Figure 3: Série de dilutions de norovirus GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ARN et de la concentration de l'ARN.

13.2 Spécificité analytique

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA® GENE Norovirus est spécifique pour les norovirus des génogroupes I et II dans les échantillons de selles humaines. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 10):

Tableau 10: Test de la réactivité croisée

Adénovirus	-	<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> subsp. <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 Réactivité analytique

La réactivité du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Norovirus a été évaluée par rapport à plusieurs génotypes des génogroupes I, II et IV de norovirus (voir tableau 11). Tous les génotypes de norovirus du panel ont été détectés par le test de RT-PCR en temps réel RIDA®GENE Norovirus.

Tableau 11: Test de la réactivité analytique










Génogroupe I de norovirus					
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	+
Génogroupe II de norovirus					
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	+				
Génogroupe IV de norovirus					
GGIV.1 – Alpatron	+				

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-05-16	Version précédente
2021-01-28	Révision générale 10. Contrôle qualité (faute de frappe) 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>In-vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliographie

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