



RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405



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



Deutsch	3
English.....	21
Español.....	39
Français.....	57
Italiano	75

RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA[®] GENE Norovirus ist eine real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Noroviren der Genogruppen I und II aus humanen Stuhlproben.^{1,2}

Die RIDA[®] GENE Norovirus real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Noroviren verursachten Gastroenteritis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Noroviren verursachen mit Abstand die meisten Fälle aller nicht bakteriellen Gastroenteritis-Ausbrüche.^{3,4,5} Eine durch Noroviren verursachte Gastroenteritis äußert sich durch starke Übelkeit, heftiges Erbrechen und schweren Durchfall. Noroviren werden sowohl mit dem Stuhl als auch mit dem Erbrochenen ausgeschieden. Eine aerogene Übertragung durch Bildung virushaltiger Aerosole ist häufig die Ursache einer sehr raschen Ausbreitung in Gemeinschaftseinrichtungen.^{6,7,8} Das Center for Disease Control (CDC, Atlanta, USA) schätzt, dass jedes Jahr in den USA durch Noroviren über 21 Millionen Fälle von akuter Gastroenteritis, 70.000 Krankenhausaufenthalte und 800 Todesfälle verursacht werden.⁹

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae*. Aufgrund ihrer Morphologie (small round structured virus (SRSV)) lassen sie sich von den klassischen Caliciviren unterscheiden. Die SRSV wurden nach dem Ort ihrer Isolierung benannt. So stand der Name Norwalk-like für alle Viren, die bei Gastroenteritis-Ausbrüchen isoliert wurden und ging auf die Erstisolierung in der Stadt Norwalk im Bundesstaat Ohio in den USA im Jahre 1972 zurück. Weitere Isolate, wie Snow Mountain, Hawaii, Montgomery County, etc. folgten.

Noroviren sind kleine, unbehüllte Viren mit einer einzelsträngigen RNA (ssRNA). Sie lassen sich in 7 Genogruppen mit derzeit über 30 verschiedenen Genotypen und einer Vielzahl von Stämmen unterteilen. Als humanpathogen sind bisher nur Vertreter aus der Genogruppe I (GGI) mit 9 Genotypen, aus der Genogruppe II (GGII) mit 22 Genotypen und aus der Genogruppe IV (GGIV) mit 2 Genotypen beschrieben.^{10,11}

3. Testprinzip

Die RIDA[®]GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR ist eine molekular-diagnostische PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Norovirus RNA (Genogruppe GGI und GGII) in humanen Stuhlproben. Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Norovirus GGI und GGII spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time PCR amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen (ORF1/ORF2 junction Region) werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA[®]GENE Norovirus Test enthält eine **Internal Control RNA** (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	braun
N	No Template Control	1x	450 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).

- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA® GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab. 2: Benötigtes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Qiagen	QIASymphony SP/AS
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II

- RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0

- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-freies, DEPC-behandeltes Wasser)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten. Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.

Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen, wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die RNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches RNA-Extraktionskit (z.B. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) oder RNA-Extraktionssystem (z.B. Maxwell[®] RSC (Promega)) für Stuhlproben empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:10 mit PCR-Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 1 min bei 13.000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA[®] GENE Norovirus Test enthält eine Internal Control RNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control RNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control RNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control RNA dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control RNA während

der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control RNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der **Internal Control RNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, den **Enzyme Mix**, die **Positive Control**, die **No Template Control** und die **Internal Control RNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren

9.2 Herstellung des RT-PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.**

Proben: Je 5 µl RNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als **Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der Internal Control RNA zum RT-PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.**

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die RT-PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR-Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR-Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR-Profil für Mx3005P, ABI 7500, Rotor-Gene Q, CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	Norovirus	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICR	Yellow	
Bio-Rad CFX 96™	Norovirus	FAM	
	ICR	VIC	

Hinweis: Bei Verwendung des LightCycler® 2.0 muss die „Seek Temperature“ von „30“ auf „58“ erhöht werden.

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb. 1)

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

**¹ Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.*

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

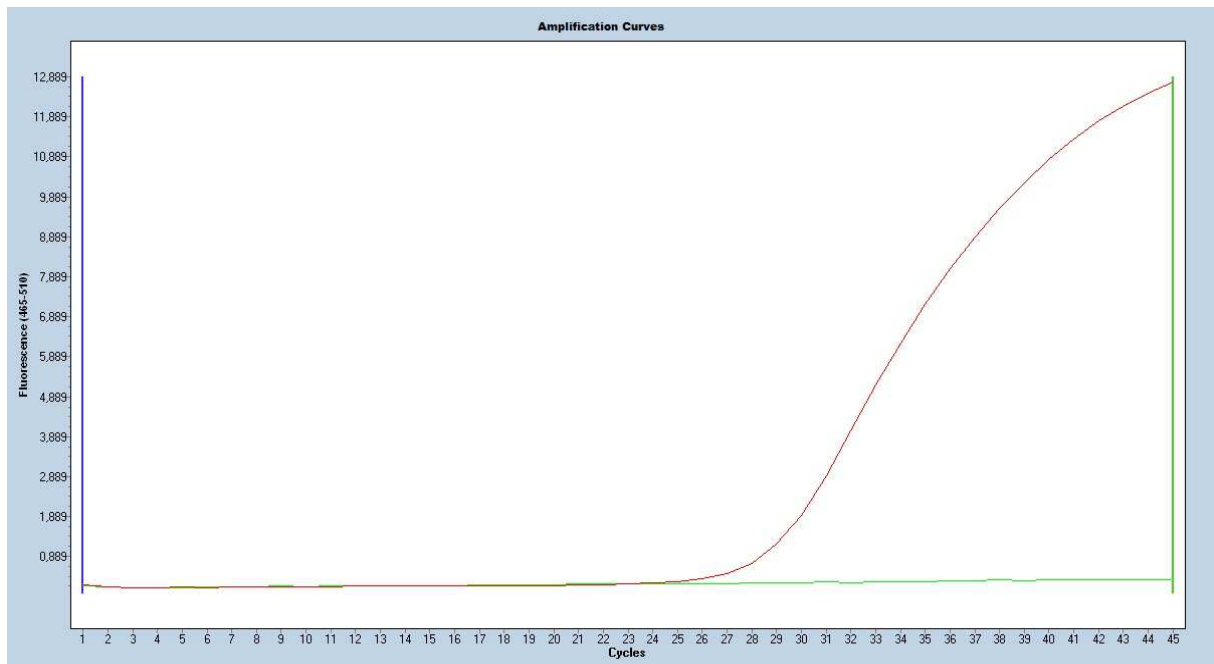


Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Norovirus) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Zielgen		
Norovirus	ICR	Ergebnis
Positiv	positiv/negativ	Norovirus nachweisbar
Negativ	positiv	Norovirus nicht nachweisbar
Negativ	negativ	Ungültig

Norovirus ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zu sehen ist.

Norovirus ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zeigt. Der Nachweis der Internal Control RNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen können.

Norovirus ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation, aber die Internal Control RNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control RNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA für Norovirus und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer Norovirus Genotypen beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE Norovirus zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielgene (ORF1/ORF2 junction Region) vorhanden sind.
8. Noroviren der Genogruppe IV, die in sehr seltenen Fällen auch Menschen infizieren können (s. Tab. 11), werden ebenfalls mit RIDA[®]GENE Norovirus nachgewiesen.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien / Reaktion.

Die folgenden Abbildungen 2 und 3 zeigen eine Verdünnungsreihe jeweils von Norovirus GGI und GGII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II (s. Abb. 2).

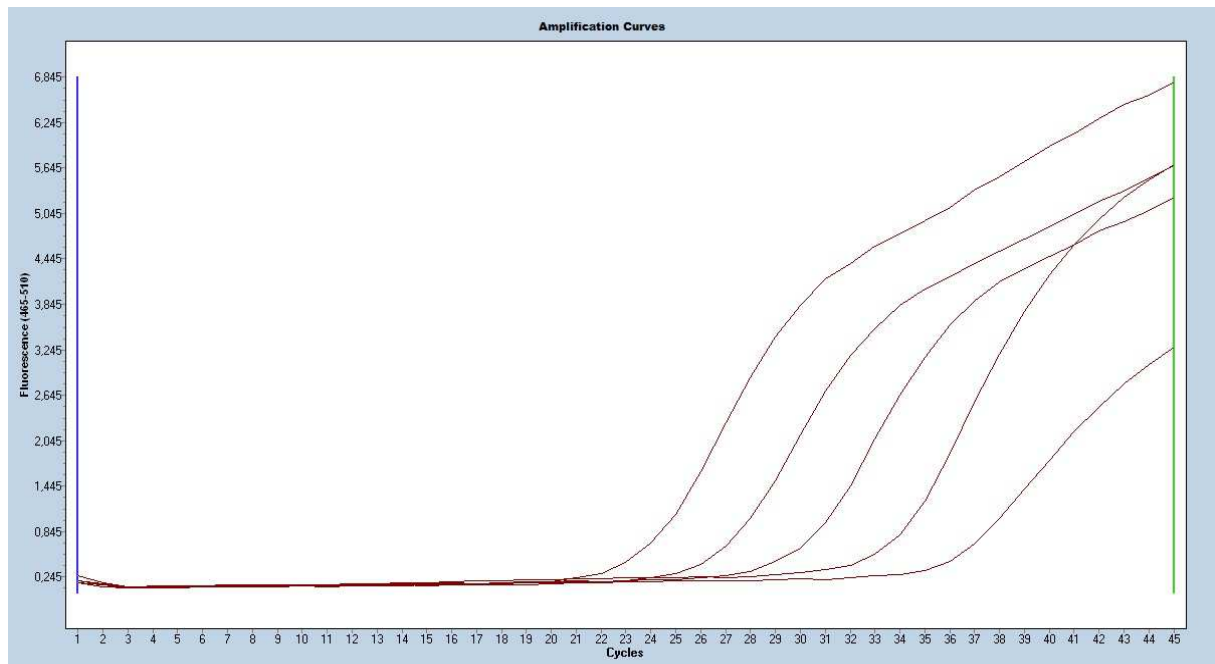


Abb. 2: Verdünnungsreihe Norovirus GGI ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

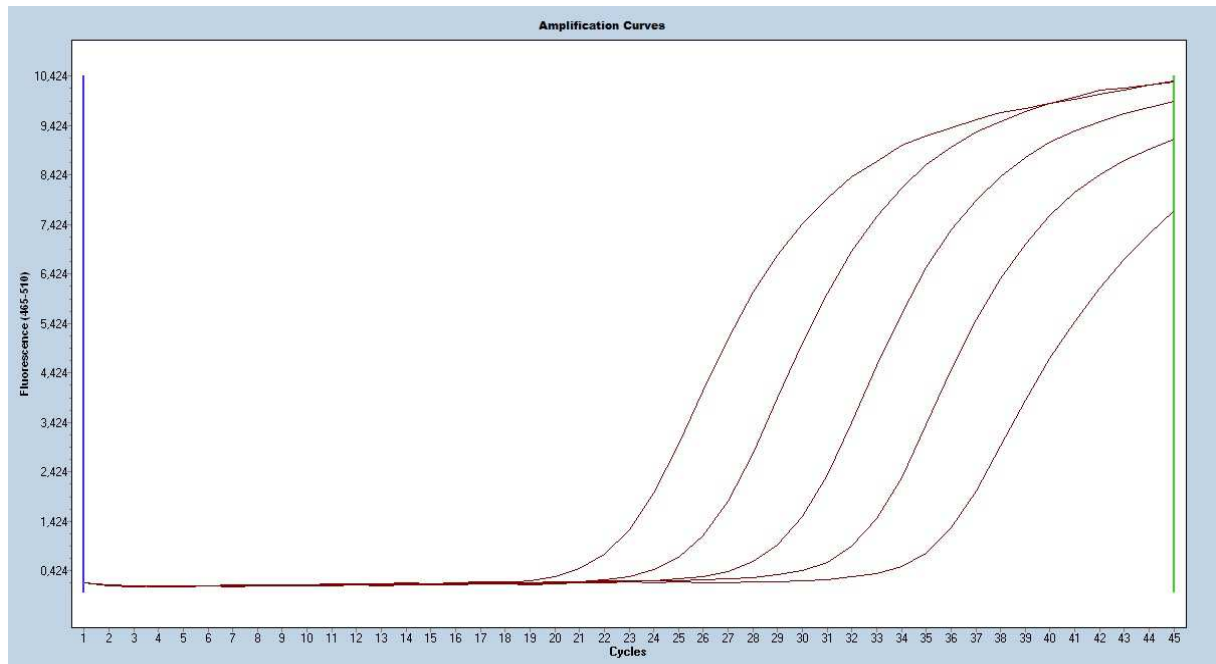


Abb. 3: Verdünnungsreihe Norovirus GGII (5×10^5 - 5×10^1 RNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, RNA-Extraktion und RNA-Gehalt.

13.2 Analytische Spezifität

Die RIDA® GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Noroviren der Genogruppen I und II aus humanen Stuhlproben. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 10).

Tab. 10: Kreuzreaktivitätstestung

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>	-	Clostridium difficile	-	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 Analytische Reaktivität

Die Reaktivität der RIDA[®]GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR wurde mit verschiedenen Genotypen der Norovirus Genogruppe I, II und IV untersucht (s. Tab. 11). Alle Norovirus Genotypen des Probenpanels wurden mit der RIDA[®]GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR nachgewiesen.

Tab. 11: Analytische Reaktivitätstestung










Norovirus Genogruppe 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 Genogruppe 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 Genogruppe IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2014-11-09	Freigabeversion
2018-05-16	Generelle Überarbeitung
2018-05-16	4. Packungsinhalt 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9. Testdurchführung 10. Qualitätskontrolle 13. Leistungsmerkmale 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstelldatum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Nicht zutreffend

16. Literatur

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

RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA[®]GENE Norovirus is a real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection of norovirus (genogroup I and II) from human stool samples.^{1,2}

RIDA[®]GENE Norovirus real-time RT-PCR is intended for use as an aid in diagnosis of gastroenteritis caused by noroviruses.

2. Summary and Explanation of the test

Noroviruses cause by far the most cases of non-bacterial gastroenteritis outbreaks.^{3,4,5} A gastroenteritis caused by norovirus is manifested by severe nausea, vomiting and diarrhea. Noroviruses are egested by stool and with the vomit. An airborne transmission through aerosols containing the virus is often the cause of a very rapid spreading in shared facilities.^{6,7,8} The CDC estimates that more than 21 million cases of acute gastroenteritis, 70.000 hospitalisations and 800 deaths are caused by norovirus infections each year in the United States.⁹

Noroviruses belong to the family of *Caliciviridae*. Because of their morphology (small round structured virus (SRSV)), they can be distinguished from the traditional calicivirus. The SRSVs were named after the place of their isolation. Thus, the name Norwalk-like stood for all viruses which have been isolated during outbreaks of gastroenteritis. The name originated from the first SRSV isolation in the city of Norwalk, Ohio, in the US in 1972. Later, other isolates like Snow Mountain agent, Hawaii agent and Montgomery County agent were named in a similar way.

Noroviruses are small, non-enveloped viruses with a single-stranded RNA (ssRNA). They can be grouped in 7 genogroups with currently over 30 genotypes and a multiplicity of clades. So far, human pathogens have only been described from genogroup I (GI) with 9 genotypes, from genogroup II (GII) with 22 genotypes and from genogroup IV (GIV) with two genotypes.^{10,11}

3. Test principle

The RIDA[®]GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR is a molecular diagnostic test for the direct, qualitative detection of norovirus RNA (genogroup GI and GII) from human stool samples. The detection is done in a one step real-time RT-PCR format where the reverse transcription is followed by the PCR in the same reaction tube. The isolated RNA is transcribed into cDNA by a reverse transcriptase. Gene fragments specific for norovirus GI and GII are subsequently amplified by real-time PCR. The amplified targets (ORF1/ORF2 junction region) are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE Norovirus assay contains an **Internal Control RNA** (ICR) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR-inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	red
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brown
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®]GENE Norovirus real-time RT-PCR Assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platform	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Qiagen	QIA Symphony SP/AS
Real-time PCR instruments	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler[®] 480II

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) for use with the LightCycler[®] 2.0

- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)

- Centrifuge with a rotor for the reaction vials

- Vortexer

- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)

- Filter tips

- Powder-free disposal gloves

- PCR water (BioScience grade, nuclease-free, DEPC treated water)

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed. The instruction manual for the test procedure has to be followed. Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes. During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure. Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.

All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com.

8. Collection and Storage of samples

8.1 Sample Preparation from stool samples

For RNA isolation of human stool samples, use a commercially available RNA extraction kit (e.g. RIDA[®] Xtract (R-Biopharm)) or RNA extraction system (e.g. Maxwell[®] RSC (Promega)). Extract viral RNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool sample before extraction 1:10 with water. Vortex intensely and centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Use from the supernatant an appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA[®]GENE Norovirus assay contains an **Internal Control RNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control RNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** should be added to the Master- Mix (s. Tab. 4).

If the **Internal Control RNA** is used as a extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control RNA** should always be added to the specimen-lysis buffer mixture and must **not** be added directly to the

specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the negative control and positive control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One positive control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Enzyme Mix**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control RNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICR as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master-Mix (ICR only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (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
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the RT-PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR-Mix of the negative control.

Samples: Add 5 µl RNA-Extract to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR Mix of the positive control.

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The RT-PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time RT-PCR profile

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and Extension occur in the same step

Note: The universal real-time PCR profile can also be used for DNA assays if RIDA® GENE DNA and RIDA® GENE RNA real-time PCR assays are combined in one run.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR instrument	Detection	Detection Channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	Norovirus	530	RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	533/580	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICR	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Check that reference dye is none
	ICR	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Green	The gain settings have to be set to 5
	ICR	Yellow	
Bio-Rad CFX 96™	Norovirus	FAM	
	ICR	VIC	

Note: Upon usage with the LightCycler® 2.0, the “Seek Temperature” has to be increased from “30” to “58”.

10. Quality Control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer`s instructions. Negative control and positive control have to show correct results (see Table 8, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of 10^3 copies/ μ l. In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 8: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICD Ct	Target Ct
Positive control	Positive	NA * ¹	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

*¹ No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the positive control.

If the positive control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the positive control is valid prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

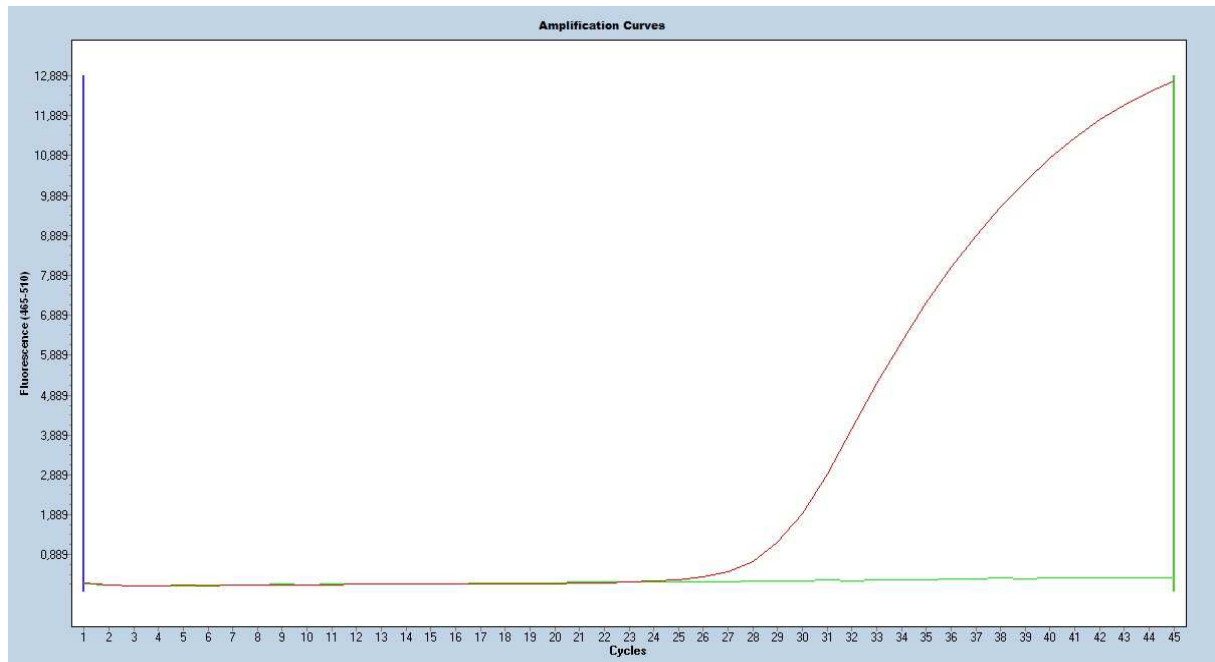


Fig. 1: Correct run of the positive control and negative control (Norovirus) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 9.

Tab.9: Sample interpretation

Norovirus	ICR	Result
positive	positive/negative	Norovirus detected
negative	positive	Norovirus not detected
negative	negative	Invalid

Norovirus is detected, if the sample RNA and the Internal Control RNA show an amplification signal in the detection system.

Norovirus is also detected, if the sample RNA shows an amplification signal but none for the Internal Control RNA in the detection system. The detection of the Internal Control RNA is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control RNA.

Norovirus is not detected, if the sample RNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control RNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control RNA.

A sample is invalid, if the sample RNA and Internal Control RNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor.

The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for stool samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a viral load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new norovirus genotypes resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE Norovirus assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target gene (ORF1/ORF2 junction region).
8. Norovirus genogroup IV, which very rarely infect humans (see Tab. 11), will be also detected by the RIDA[®]GENE Norovirus assay,

13. Performance characteristics

13.1 Analytical sensitivity

The RIDA[®] GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR has a limit of detection of ≥ 50 RNA copies per reaction (see Fig. 2).

The following figures 2 and 3 show a dilution series of Norovirus GI and GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

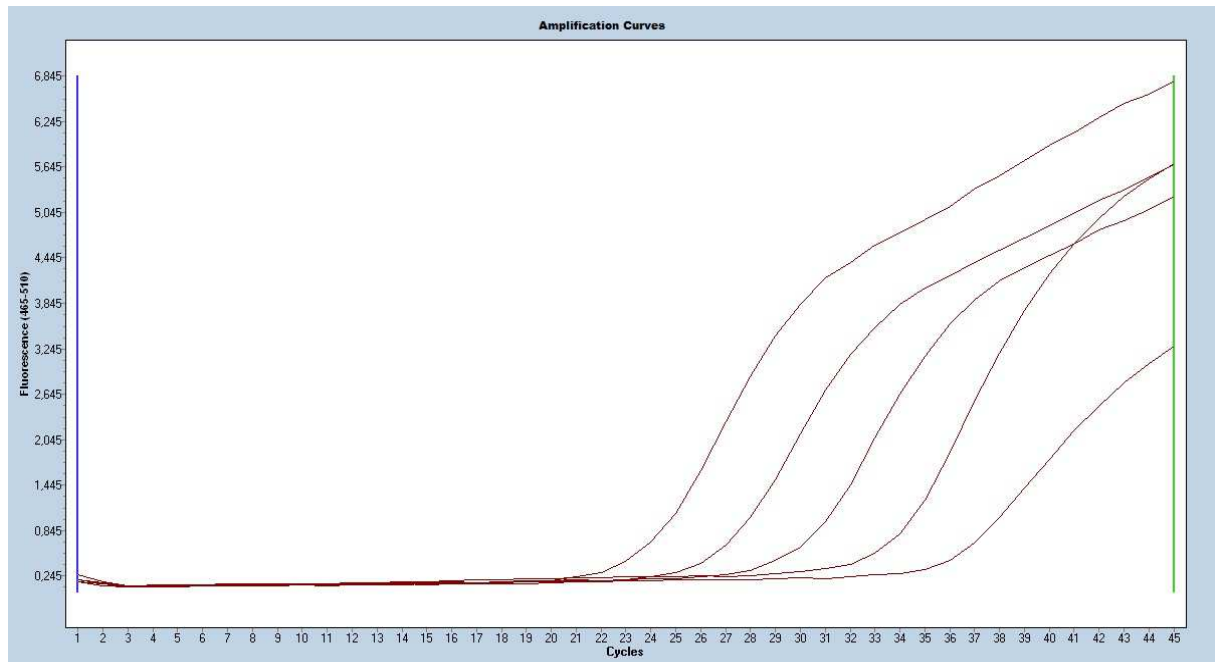


Fig. 2: Dilution series Norovirus GI ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

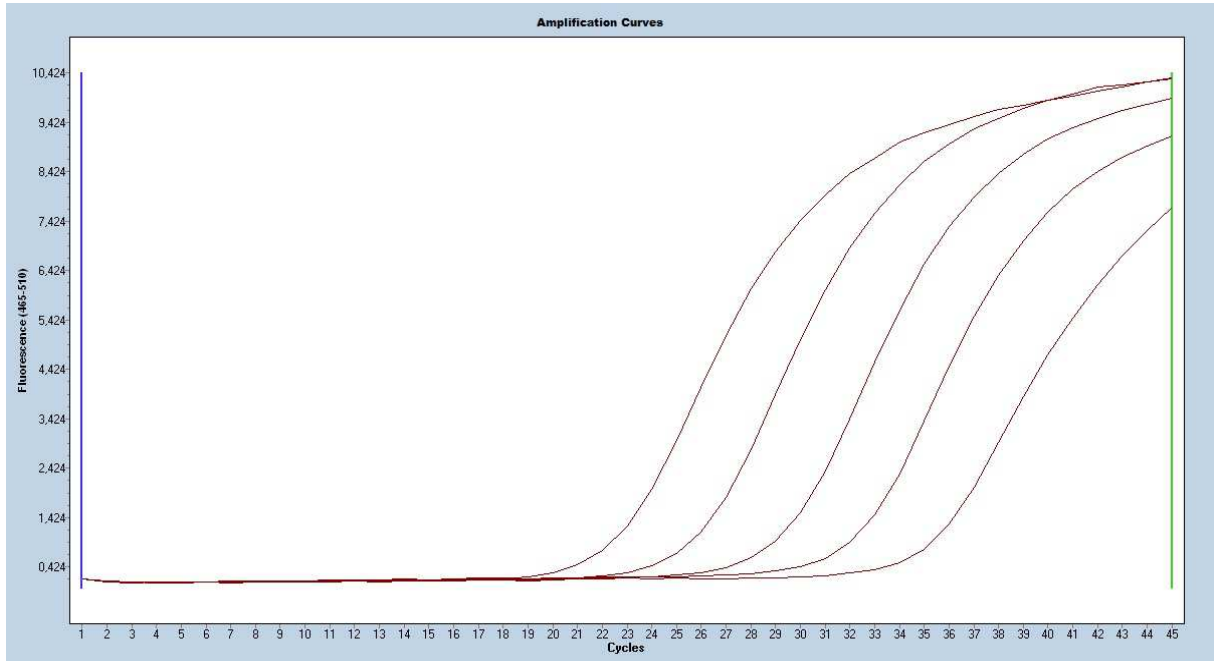


Fig. 3: Dilution series Norovirus GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, RNA extraction and RNA concentration.

13.2 Analytical specificity

The RIDA[®] GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR is specific for Norovirus of the genogroups I and II from human stool samples. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 10):

Tab. 10: Cross-reactivity testing

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> 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 Analytical reactivity

The reactivity of the RIDA[®]GENE Norovirus multiplex real-time RT-PCR was evaluated against multiple genotypes of the Norovirus genogroup I, II and IV (see Tab. 11). All Norovirus genotypes of the panel were detected by the RIDA[®]GENE Norovirus real-time RT-PCR.

Tab. 11: Analytical reactivity testing










Norovirus genogroup 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 genogroup 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 genogroup IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2014-11-09	Release version
2018-05-16	General revision
2018-05-16	4. Reagents provided 6. Additional necessary reagents and necessary equipment 9. Test procedure 10. Quality control 13. Performance characteristics 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

	For <i>in vitro</i> diagnostic use
	Consult instructions for use
	Lot number
	Expiry
	Store at
	Article number
	Number of tests
	Date of manufacture
	Manufacturer

Testspecific symbols

Not applicable

16. Literature

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

RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA[®] GENE Norovirus es un ensayo de RT-PCR en tiempo real para la detección cualitativa directa de norovirus (genogrupos I y II) en muestras de heces humanas.^{1,2}

El ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA[®] GENE Norovirus 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.^{3,4,5} 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.^{6,7,8} 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.⁹

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.^{10,11}

3. Principio del ensayo

RIDA[®]GENE Norovirus es un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real para la detección cualitativa directa de ARN de norovirus (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 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	amarilla
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	roja
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrón
N	No Template Control	1x	450 µl	blanca
P	Positive Control	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 vencimiento. Después de la fecha de vencimiento, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador a 2 - 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 - 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

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

Tabla 2: Equipamiento necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG [™]
Qiagen	QIASymphony SP/AS
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler [®] 2.0, 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.

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler[®] 480II

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler[®] 2.0

- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)

- Centrífuga y rotor para los viales de reacción

- Agitador vórtex

- Pipetas (0.5 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl)

- Puntas con filtro

- Guantes desechables sin talco

- Agua para PCR (Grado BioScience, sin nucleasas, agua tratada con DEPC)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Seguir las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución de la prueba. No pipetear muestras ni reactivos con la boca. Evitar el contacto con piel herida o mucosas. Durante la manipulación de reactivos o muestras, llevar ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lavarse las manos al finalizar la ejecución de la prueba. No fumar, comer ni beber 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 utilizar el kit después de la fecha de vencimiento.

Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consultar las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consultar la hoja de datos de seguridad (SDS) en 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 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 contiene un Internal Control RNA que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza 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 añadirse siempre a la mezcla de búfer 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 debe 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 y 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 - 8 °C) durante el paso 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	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

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
	Total	21,0 µl	231,0 µl

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: Añada 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: Añada 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 y 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal por RT-PCR en tiempo real

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

Transcripción inversa	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
PCR 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 el mismo paso.

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 el mismo paso

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 ADN RIDA® GENE y de ARN RIDA® GENE por PCR en tiempo real.

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® 2.0	Norovirus	530	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	Se necesita el RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna)
	ICR	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Compruebe que el colorante de referencia sea «none» (ninguno)
	ICR	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Verde	La ganancia debe configurarse en 5
	ICR	Amarillo	
Bio-Rad CFX 96™	Norovirus	FAM	
	ICR	VIC	

Nota: Cuando se usa con el LightCycler® 2.0, «Seek Temperature» (temperatura de búsqueda) debe aumentarse de «30» a «58».

10. Control de Calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real utilizado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. El control negativo y el control positivo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8, figura 1) para que la corrida se considere válida.

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

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

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICD	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	NA *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 vencimiento de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta de la prueba

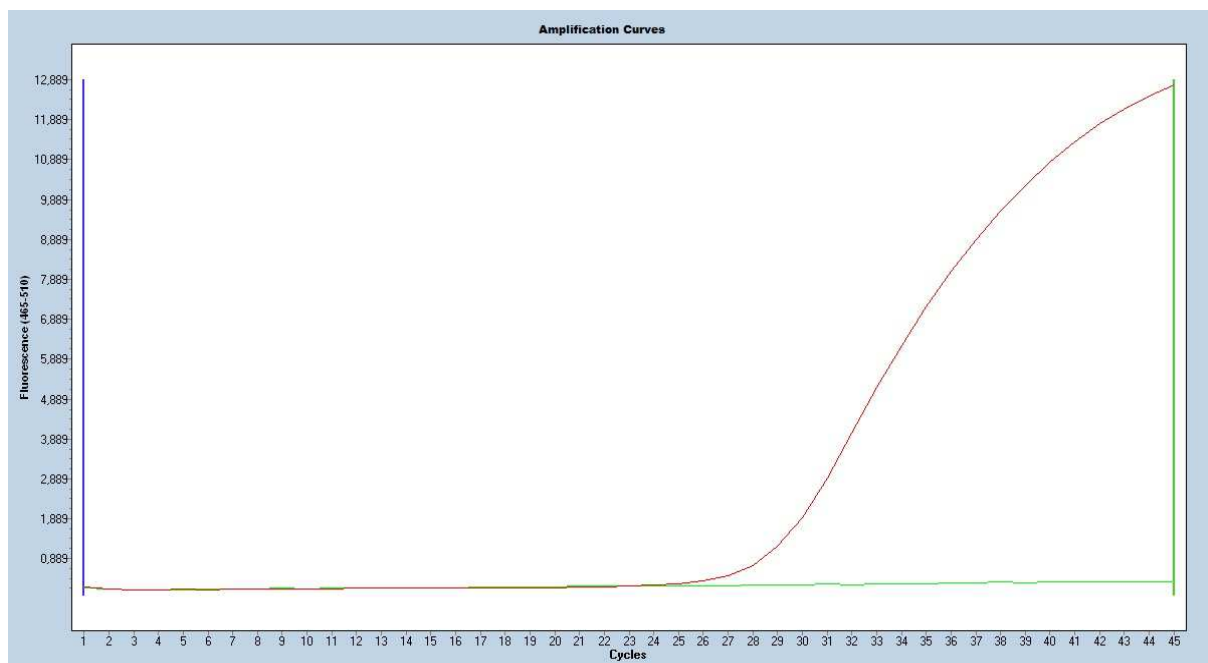


Fig. 1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (Norovirus) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

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

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Norovirus	ICR	Resultado
positivo	positivo/negativo	Norovirus detectado
negativo	positivo	Norovirus no detectado
negativo	negativo	No válido

Se detectan norovirus si el ARN de la muestra y el **Internal Control RNA** muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detectan norovirus 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.

No se detectan norovirus 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.
6. Como ocurre con todas las pruebas diagnósticas 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 de la prueba 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. Los norovirus del genogrupo IV, que muy rara vez infectan a los humanos (consulte la tabla 11), también se detectan con el ensayo RIDA[®] GENE Norovirus.

13. Características de rendimiento

13.1 Sensibilidad analítica

El ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Norovirus tiene un límite de detección ≥ 50 copias de ARN por reacción (consulte la figura 2).

Las siguientes figuras 2 y 3 muestran una dilución seriada de norovirus GI y GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copias de ARN/ μ l) en el LightCycler® 480II.

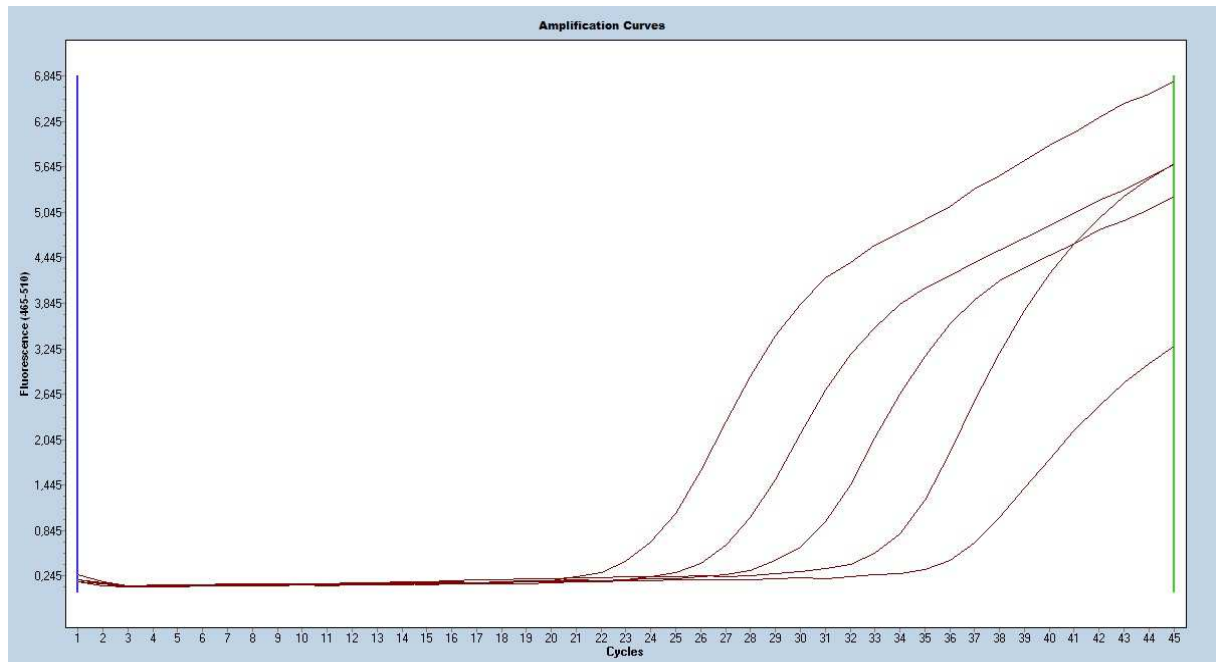


Fig. 2: Dilución seriada de norovirus GI ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copias de ARN/ μ l) en el LightCycler® 480II

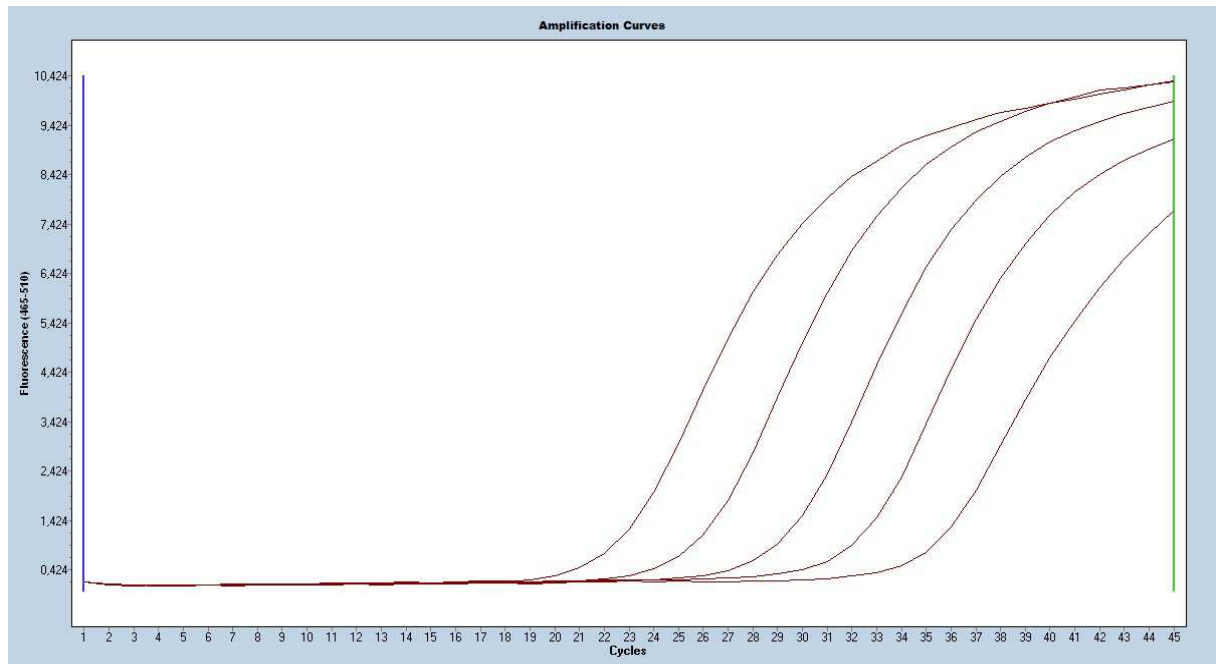


Fig. 3: Dilución seriada de norovirus GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copias de ARN/ μ l) en el LightCycler[®] 480II

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 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: Pruebas 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> 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 Reactividad analítica

La reactividad del ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real RIDA® GENE Norovirus 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 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 – Den Haag	+
GGII.4 – Bristol, Grimsby 2004	+				
Norovirus, genogrupo IV					
GGIV.1 – Alpatron	+				

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
09/11/2014	Versión de lanzamiento
16/05/2018	Revisión general
16/05/2018	4. Reactivos suministrados 6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario 9. Ejecución de la prueba 10. Control de calidad 13. Características de rendimiento 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
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de pruebas
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

No aplicable

16. Referencias bibliográficas

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

RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405

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	QIASymphony 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 ICD	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

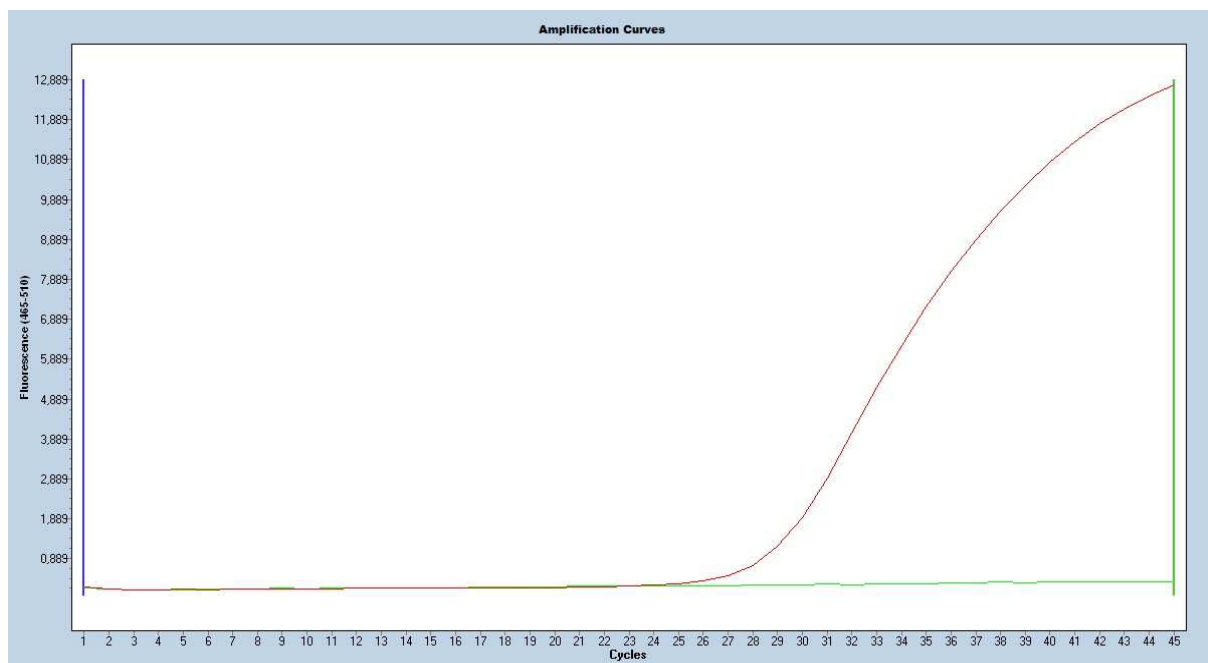


Figure 1 : Exécution correcte des contrôles positif et négatif (norovirus) sur le LightCycler® 480II

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.

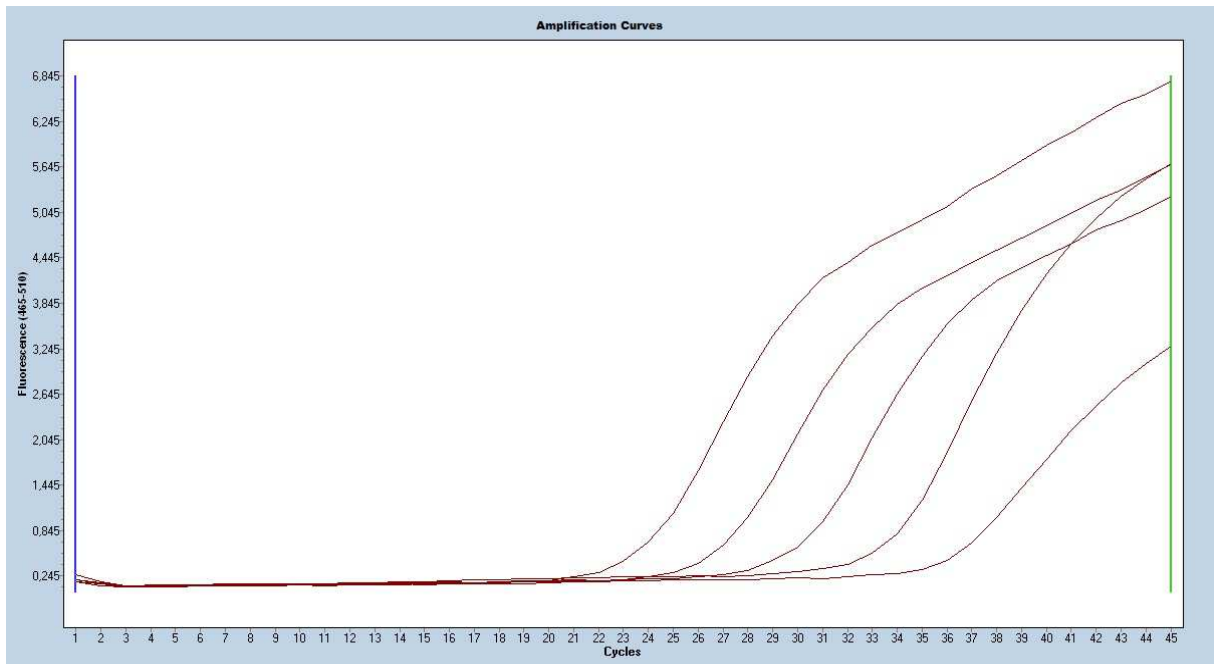


Figure 2 : Série de dilutions de norovirus GI ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

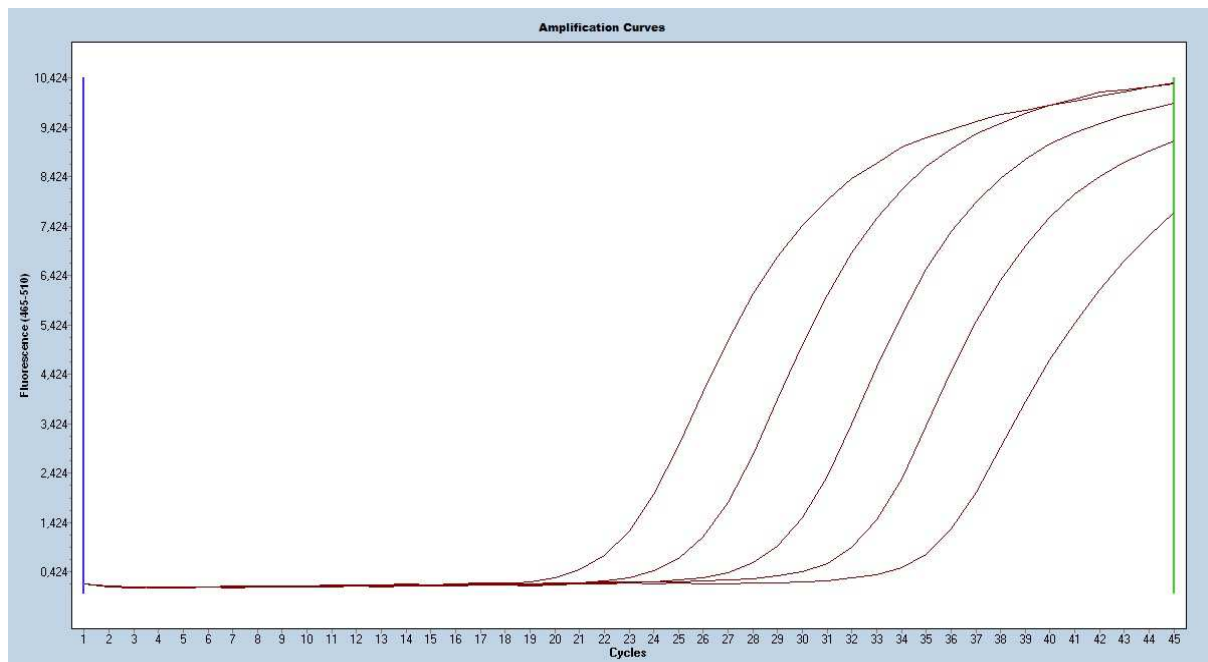


Figure 3 : Série de dilutions de norovirus GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler[®] 480II

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>	-	Clostridium difficile	-	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
09/11/2014	Version pour la publication
16/05/2018	Révision générale
16/05/2018	4. Contenu du paquet 6. Autres réactifs et matériel nécessaires 9. Réalisation du test 10. Contrôle qualité 13. Performances 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

Sans objet

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

RIDA[®] GENE Norovirus

REF PG1405

1. Campo di applicazione

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

RIDA[®] GENE Norovirus RT-PCR real-time 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 è un test diagnostico molecolare per la rivelazione qualitativa diretta di RNA Norovirus (genogruppo GI e 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 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	2	1050 µl	giallo
2	Enzyme Mix	1	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2	1700 µl	marrone
N	No Template Control	1	450 µl	bianco
P	Positive Control	1	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.
- Scongela 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/scongelo 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 RT-PCR real-time 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 easy [®] MAG [™]
Qiagen	QIAasympphony SP/AS
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96 [™]
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: 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

- RIDA[®] GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler[®] 2.0

- 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, trattata con DEPC)

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 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.

Nota: 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.

Nota: 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 RT-PCR real-time universale

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

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

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

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

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

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

Nota: 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	Nota
Roche LightCycler® 2.0	Norovirus	530	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Norovirus	465/510	È necessario RIDA® GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
ABI 7500	Norovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata
	ICR	VIC	
Agilent Techn. Mx3005P	Norovirus	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento
	ICR	HEX	
Qiagen Rotor-Gene Q	Norovirus	Verde	Le impostazioni di amplificazione (gain) devono essere regolate su 5
	ICR	Giallo	
Bio-Rad CFX 96™	Norovirus	FAM	
	ICR	VIC	

Nota: per l'uso con il LightCycler® 2.0, il valore del parametro "Seek Temperature" deve essere aumentato da "30" a "58".

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, i controlli negativo e positivo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 8, Fig. 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

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

Campione	Risultato del test	Ct ICD	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

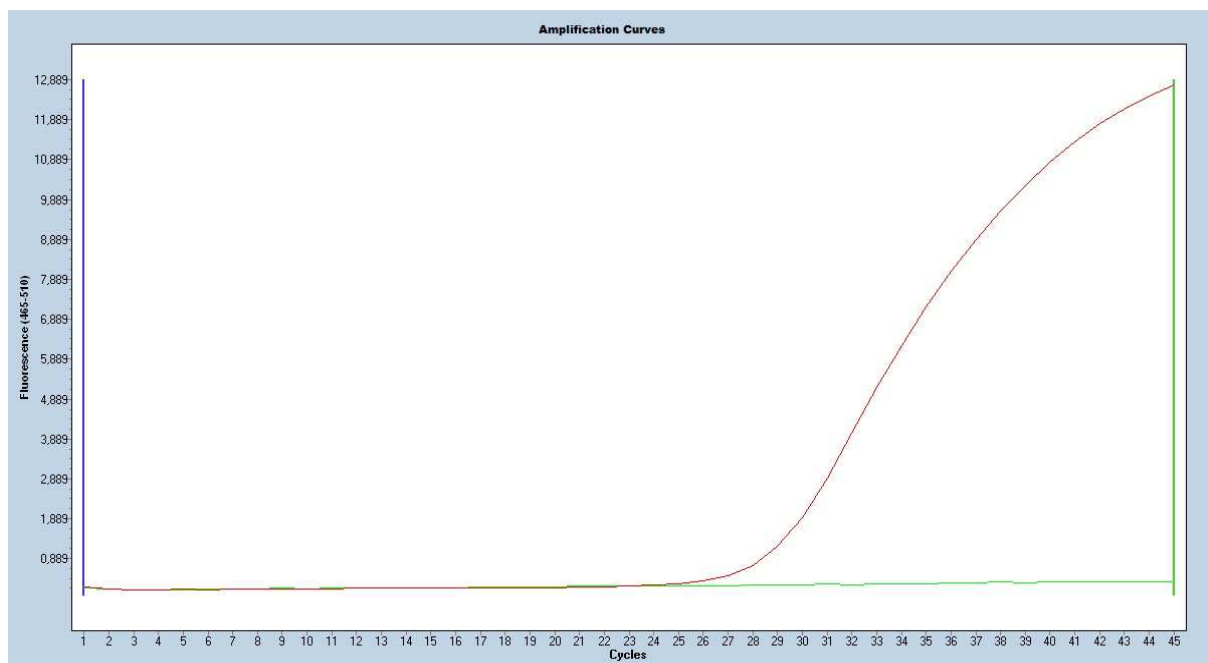


Fig. 1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Norovirus) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tab.9: Interpretazione del campione

Norovirus	ICR	Risultato
positivo	positivo/negativo	Norovirus rivelato
negativo	positivo	Norovirus non rivelato
negativo	negativo	Non valido

Norovirus è comprovabile se sia l'RNA del campione sia l' **Internal Control RNA** mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Norovirus è inoltre comprovabile 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.

Norovirus non è comprovabile se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale 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 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.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

Il test RIDA® GENE Norovirus RT-PCR real-time multiplex ha un limite di rivelazione di ≥ 50 copie di RNA per reazione (vedere Fig. 2).

Le figure 2 e 3 seguenti mostrano una serie di diluizioni di Norovirus GI e GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler® 480II.

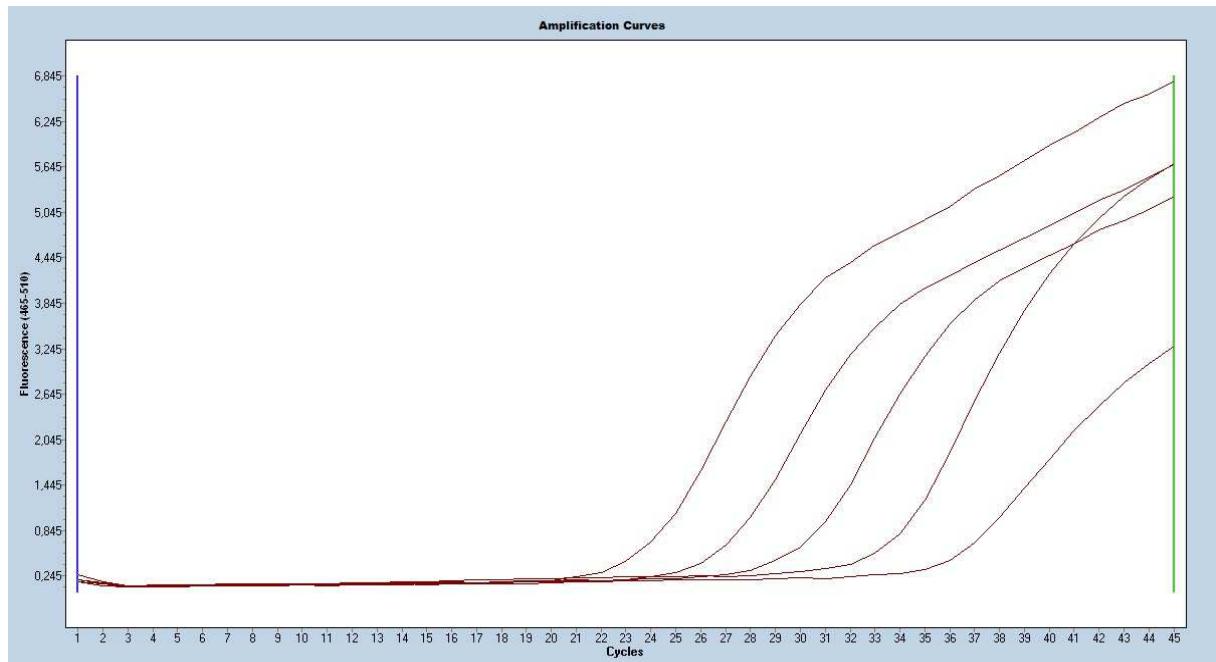


Fig. 2: Serie di diluizioni di Norovirus GI ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler® 480II

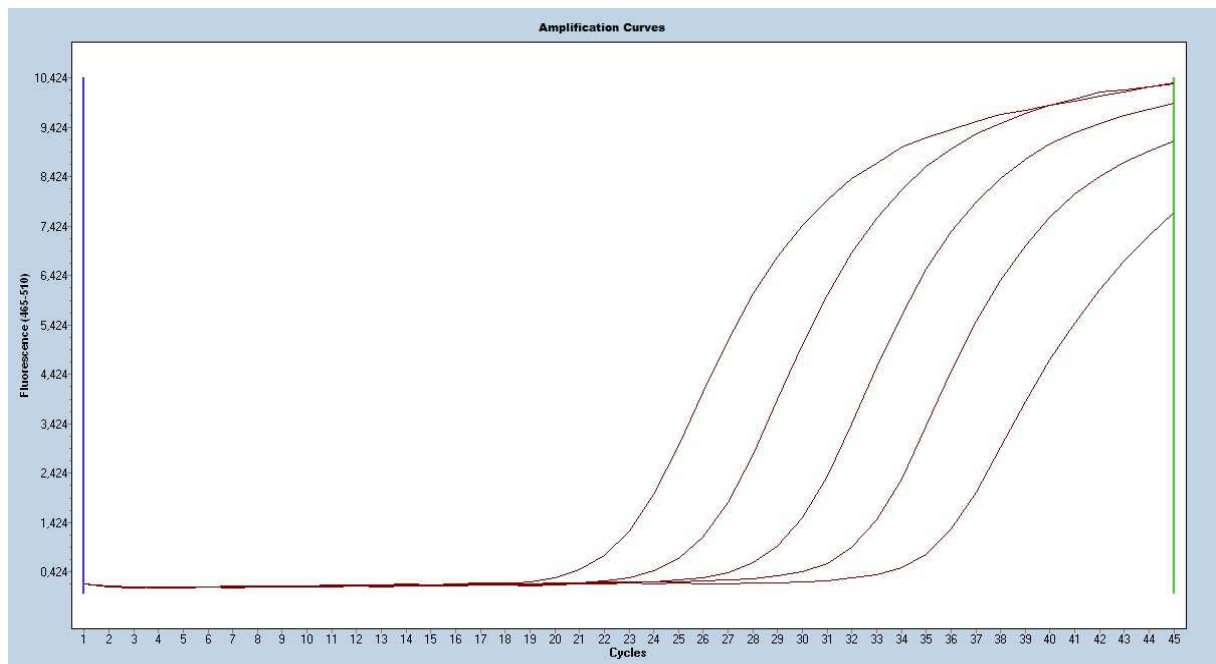


Fig. 3: Serie di diluizioni di Norovirus GII ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^1$ copie di RNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

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

Il RIDA[®] GENE Norovirus 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	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	Clostridium difficile	-	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> sottosp. <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> sottosp. <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 Reattività analitica

La reattività di RIDA[®]GENE Norovirus 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 RT-PCR real-time.

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 – Alpatron	+				

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
09/11/2014	Versione di rilascio
16/05/2018	Revisione generale
16/05/2018	4. Contenuto della confezione 6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 13. Prestazioni e caratteristiche 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Produttore

Simboli specifici nel testo

Non pertinente

16. Bibliografia

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