

Vitassay qPCR

Norovirus GII

PCR en tiempo real para la detección cualitativa de Norovirus GII en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection of Norovirus GII in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Norovirus GII, permite la detección de Norovirus GII mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por Norovirus GII.

Referencias

Vitassay qPCR Norovirus GII 4x8 -well strip, low profile	7041016
Vitassay qPCR Norovirus GII 4x8-well strip, high profile	7042016

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S016/ 7042S016	Norovirus GII strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C016	Norovirus GII Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los Norovirus son un grupo de virus genéticamente diverso que pertenecen a la familia *Caliciviridae* y que pueden clasificarse en 6 genogrupos diferentes, de los cuales los genogrupos GI, GII y GIV son responsables de las enfermedades en humanos. El GI incluye nueve genotipos clasificados en base a la proteína principal de la cápside (VP1), mientras que hasta la fecha, el GII contiene 22 genotipos. En humanos, los virus GII.4 son los causantes de la mayoría de los brotes de gastroenteritis relacionados con Norovirus en todo el mundo.

Los Norovirus se transmiten principalmente a través de la ruta oro-fecal, ya sea por contacto directo persona a persona o por el consumo de alimentos y/o agua potable contaminados con materia fecal. Estos virus pueden causar vómitos, diarrea no hemorrágica, náuseas, calambres abdominales y fiebre de bajo grado.

Los Norovirus son virus no envueltos de RNA monocatenario positivo. El genoma lineal de RNA se organiza en tres *open reading frames* (ORFs). El ORF1 codifica un gran polipéptido, que es escindido por la proteasa que codifica el virus en seis proteínas no estructurales incluyendo la RNA polimerasa viral. El ORF2 y el ORF3 codifican las proteínas de la cápside, VP1 y VP2 respectivamente. La zona de unión ORF1-ORF2 es la región más conservada del genoma y la mejor diana para la detección de Norovirus.

Principio del test

Vitassay qPCR Norovirus GII se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona de unión ORF1-ORF2 codificado por el genoma de Norovirus GII. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un primer específico mediante un paso de transcripción inversa seguido, de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia del virus Norovirus GII se detecta mediante un aumento de la fluorescencia durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' nucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrolisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Norovirus GII se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal

FAM mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit (Promega).

QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAcube instrument (Qiagen).

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen).

NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).

RIDA® Xtract (R-biopharm).

NucliSENS® EasyMAG™ platform (bioMérieux).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Norovirus GII Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	45°C	15 min	1
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Norovirus GII) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™

Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de Norovirus GII (FAM).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

Norovirus GII (FAM)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Norovirus GII Positivo
-	+	-	+	Norovirus GII Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todas las bacterias no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Un total de 138 muestras fecales provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR a tiempo real utilizando dos test de diagnóstico molecular: Vitassay qPCR Norovirus GII y RIDA@GENE Norovirus I&II (r-Biopharm). El patógeno de estudio fue detectado en 81 muestras por ambos kits. Vitassay qPCR Norovirus GII identificó 2 muestras adicionales como positivas débiles, cuyo resultado pudo ser confirmado mediante RT-PCR convencional y posterior secuenciación.

Además, Vitassay qPCR Norovirus GII fue evaluado con el programa externo QCMD 2017 Norovirus RNA EQA programme (NVRNA17). El programa consistía en un panel de 10 muestras suspendidas en medio de transporte positivas o negativas al patógeno de estudio. Vitassay qPCR Norovirus GII detectó correctamente todas las muestras del panel.

Estos resultados muestran la alta sensibilidad y especificidad para detectar Norovirus GII del kit de diagnóstico molecular Vitassay qPCR Norovirus GII.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de las diferentes bacterias (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Norovirus GII fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de Norovirus GII entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada		
Adenovirus 40/41	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>
Astrovirus Genotipos I-VIII	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Salmonella paratyphi B</i>
Rotavirus A	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	<i>Salmonella bongori</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>entérica</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Y. enterocolitica</i> O:3 / O:9
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella typhi</i>	

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Norovirus GII para Norovirus GII ha sido evaluado frente a Norovirus GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, GII.17, GII.21, GII.b, GII.Pe, GII.Pg, GII.P2, GII.P4, GII.P7, GII.P17 y GII.P21, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Norovirus GII, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por Norovirus GII. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras fecales humanas. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con las diferentes bacterias, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Norovirus GII allow the detection and differentiation of Norovirus GII by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Norovirus GII infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Norovirus GII 4x8 -well strip, low profile	7041016
Vitassay qPCR Norovirus GII 4x8-well strip, high profile	7042016

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S016/ 7042S016	Norovirus GII strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C016	Norovirus GII Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Noroviruses are a group of genetically diverse viruses that belong to the family *Caliciviridae* and that can be classified into 6 different genogroups, of which viruses from genogroup GI, GII and GIV are responsible for disease in humans. GI includes nine genotypes based on the complete major capsid protein (VP1), whereas to date, GII contains 22 genotypes. In humans, GII.4 viruses cause the majority of norovirus-related gastroenteritis outbreaks worldwide.

Noroviruses are transmitted primarily through the fecal-oral route, either by direct person-to-person spread or fecally contaminated food or water. These viruses cause vomiting, nonbloody diarrhea, nausea, abdominal cramps and low-grade fever.

Noroviruses are positive-sense, single-stranded, nonenveloped RNA viruses. The linear RNA genome is organized in three open reading frames (ORFs). ORF1 encodes a large polyprotein, which is cleaved by the virus encoded protease into six non-structural proteins including the viral RNA polymerase. ORF2 and ORF3 encode the major and minor capsid proteins VP1 and VP2, respectively. The ORF1-ORF2 junction is the most highly conserved region of the genome and the best target for detection of Norovirus.

Principle of the test

Vitassay qPCR Norovirus GII is designed for the identification of Norovirus GII virus in clinical specimens to aid in the assessment of infections caused by this virus.

Vitassay qPCR Norovirus GII is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the ORF1-ORF2 junction gene encoded by the Norovirus GII virus genome. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The presence of Norovirus GII virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Norovirus GII test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the Norovirus GII target sequence is detected through the FAM channel and whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Attached II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.

- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® RSC Blood DNA Kit (Promega).

QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAcube instrument (Qiagen).

QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen).

NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).

RIDA® Xtract (R-biopharm).

NucliSENS® EasyMAG™ platform (bioMérieux).

Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Norovirus GII Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription	45°C	15 min	1
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Norovirus GII) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II)

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Norovirus GII) which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

Norovirus GII (FAM)	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Norovirus GII Positive
-	+	-	+	Norovirus GII Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

Overall, 138 faecal samples from symptomatic patients were tested by Real Time PCR using two different molecular diagnostic tests: Vitassay qPCR Norovirus GII and RIDA@GENE Norovirus I&II (r-Biopharm). Norovirus GII was detected in 81 samples by both kits. In addition, Vitassay qPCR Norovirus GII identified two additional low positives

samples that could be confirmed as positive by conventional RT-PCR and subsequently sequencing.

In addition, Vitassay qPCR Norovirus GII was evaluated with the external programme QCMD 2017 Norovirus RNA EQA programme (NVRNA17). This consisted of a panel of 10 samples in transport medium positive or negative to the studied pathogen. Vitassay qPCR Norovirus GII detected correctly all samples of the panel.

These results show the high sensitivity and specificity for detecting Norovirus GII from the molecular diagnostic kit Vitassay qPCR Norovirus GII.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Norovirus GII templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Norovirus GII was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of Norovirus GII was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
Adenovirus 40/41	<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>
Astrovirus Genotypes I-VIII	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Salmonella paratyphi B</i>
Rotavirus A	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>subsp. hydrophila</i>	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	<i>Salmonella bongori</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	<i>Salmonella entérica subsp. entérica</i>
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Helicobacter cinaedi</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	<i>Helicobacter heilmannii</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Y. enterocolitica</i> O:3 / O:9
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Salmonella typhi</i>	

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Norovirus GII for Norovirus GII was evaluated against Norovirus GII genotypes GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, GII.17, GII.21, GII.b, GII.Pe, GII.Pg, GII.P2, GII.P4, GII.P7, GII.P17 and GII.P21, showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Norovirus GII has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler® tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Norovirus GII infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with human faecal samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens must be extracted.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different bacteria, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene® Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. Vega E, Barclay L, Gregoricus N, Shirley SH, Lee D, Vinjé J. Genotypic and epidemiologic trends of norovirus outbreaks in the United States, 2009 to 2013. *J Clin Microbiol* 2014; 52(1): 147-155.
2. Trujillo AA, McCaustland KA, Zheng DP, Hadley LA, Vaughn G, Adams SM, Ando T, Glass RI, Monroe SS. Use of TaqMan real-time reverse transcription-PCR for rapid detection, quantification, and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4): 1405-1412.
3. Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015; 53(2): 373-381.
4. Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe NA, Nakagomi O. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 2013; 56(3): 185-193.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)
www.vitassay.com