

REAL TIME PCR DETECTION KIT

Norovirus GII

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-NOP106L
VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-NOP106H
VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-NOP112L
VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-NOP112H
VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-NOP113L
VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-NOP113H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification and quantification of Norovirus GII in human stool samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Norovirus GII in humans in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Norovirus GII.

2. Summary and Explanation

Norovirus (NoV) belongs to the *Caliciviridae* family and is considered to be the major cause of acute nonbacterial gastroenteritis in all age groups, worldwide. NoVs are classified into six distinct genogroups (GI-GVI) based on phylogenetic clustering of the complete VP1 amino acid sequence. In particular, genogroups GI, GII, and GIV infects humans. They are further divided into genotypes defined on the basis of either the RNA polymerase and/or the capsid protein VP1 sequences. To date, nine capsid genotypes have been recognized in GI and twenty two in GII, and three genotypes of GII (GII.11, GII.18, and GII.19) have been uniquely detected in swine. Among them, GII.4 is responsible for the majority of the norovirus outbreaks worldwide.

After an incubation period of 12 to 48 h, norovirus illness is characterized by projectile vomiting, nonbloody diarrhea, nausea, abdominal cramps, and low-grade fever. Noroviruses can infect humans via multiple routes, including the oral route, transmitted through contact with fecal matter or aerosolized vomitus from infected people, as well as contaminated surfaces, food, or water.

The norovirus genome consists of a 7.5-kb, single-stranded, positive-sense RNA containing three open reading frames (ORFs). The ORF1 encodes a polypeptide of six non-structural proteins, including RNA dependent RNA polymerase (RdRp), the ORF2 encodes the major capsid protein, VP1, whereas the ORF3 encodes the minor capsid protein, VP2. Most real-time RT-PCR assays for GI and GII norovirus target the RNA polymerase-capsid junction (ORF1-ORF2 junction), which is the most highly conserved region of the norovirus genome.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of gastroenteritis caused by Norovirus GII in human stool samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by real-time amplification of target specific primers and a fluorescent-labeled probe that hybridizes to a conserved region with ORF1-ORF2 junction.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' nuclease chemistry. This technology utilizes two primers and a hydrolysis probe and exploits the exonuclease activity of Taq DNA polymerase.

During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This step generates an increase in fluorescent signal which is proportional to the quantity of target sequence is presents in the sample. This fluorescence could be measured on a range of real time PCR platforms.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Norovirus RNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX channel.

4. Reagents provided

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-NOP1SL/ VS-NOP1SH	<i>Norovirus GII</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-NOR1C	<i>Norovirus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-NOP106L, VS-NOP106H, VS-NOP112L and VS-NOP112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-NOP1PL/ VS-NOP1PH	<i>Norovirus GII</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-NOR1C	<i>Norovirus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-NOP113L and VS-NOP113H

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using but not included in the VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposal gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped at 2-50°C for a maximum of 2 weeks.
- For long term storage the kit should be stored at 2-8°C.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Design a unidirectional process flow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials that have been exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations. 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.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend to use fresh samples.

For longer storage, the samples must be frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

We recommend to dilute stool samples before extraction. Collect a pea-size stool (approx. 8mm) and put in a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 100 µL of physiological serum or PBS. Vortex intensely and centrifuge 10,000 rpm for 1min. Use 200 µL of supernatant to perform RNA extraction.

8.1.1. RNA EXTRACTION

For RNA extraction from human stool samples you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- UltraClean® Tissue & Cells DNA/RNA Isolation Kit (Mobio).
- NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

Norovirus GII Positive Control contains high copies template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Norovirus GII* Positive Control (red vial) adding 100 µL of Water RNase/DNase free (with vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR PROTOCOL

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run. Peel off protective aluminum seal from plates or strips.

1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted *Norovirus GII* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler.

Program your thermocycler following the conditions below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45°C
1	Initial denaturalization	2 min	95°C
45	Denaturalization	10 seg	95°C
	Annealing/Data collection*	50 seg	60°C

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the annealing step (*) through the FAM (*Norovirus GII*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *Norovirus GII* positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer’s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

Norovirus GII	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	Norovirus GII Positive
-	+	-	+	Norovirus GII Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

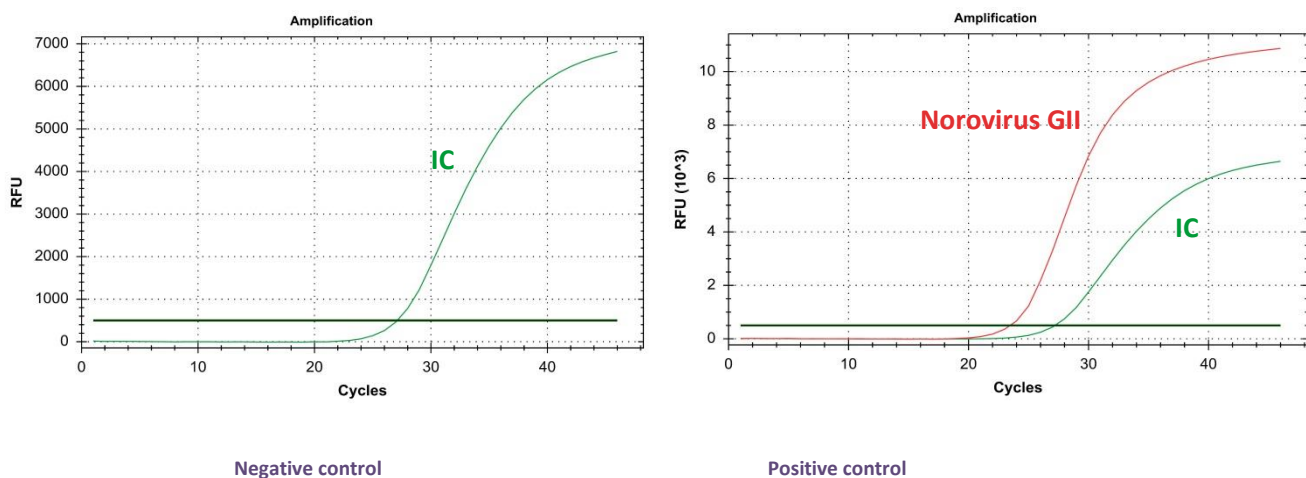
+: Amplification curve
 -: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows an amplification signal.

A sample is considered positive if the sample shows an amplification signal less than 40 Ct value but the internal control is negative. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR System.



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The result of the test should be evaluated by a health care professional and evaluated in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with human faecal samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from faecal specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- 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 Norovirus GII, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Evaluation with faecal samples from symptomatic patients was tested using VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit. These results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE Norovirus I&II (r-Biopharm)).

The results were as follows:

VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Norovirus I&II</i> (r-Biopharm)			Total
		+	-	
+	60	2 ^{*#}	62	
-	0	43	43	
Total	60	45	105	

Table 5. Comparative results

**The low amount of template RNA detected in these faecal samples is below the detection limit of the method used and so it may produce random positive results.*

#Besides, these two samples have been evaluated by a conventional RT-PCR and subsequently sequencing, confirming our results.

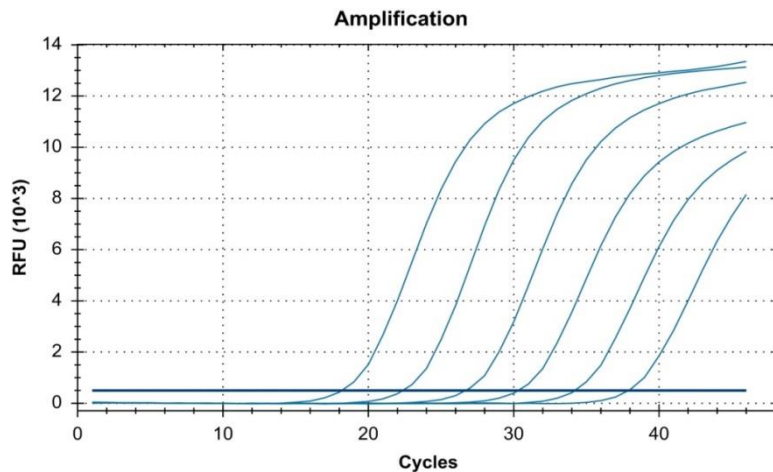
The results show a high sensitivity and specificity to detect Norovirus GII using VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 100 viral RNA copies per reaction (Figure 2).



Figure 2. Dilution series of *Norovirus GII* (10^7 - 10^2 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the *Norovirus GII* assay was confirmed by testing a panel consisting of 45 microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit not identify the following strains confirming the exclusivity of the trial.

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

Table 6. Reference pathogenic and non-pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against *Norovirus GII* genotypes GII.1, GII.2, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.Pe and GII.Pg showing positive results.

ANNEX 1:

COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with low profile block, like systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with high or regular profile block, like systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler®480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica de Norovirus GII en muestras de heces humanas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por Norovirus GII en seres humanos en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de las muestras fecales, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar Norovirus GII.

2. Introducción y explicación

Norovirus (NoV) pertenece a la familia de *Caliciviridae* y se considera la principal causa de gastroenteritis aguda no bacteriana en todos los grupos de edad en todo el mundo. NoVs se clasifican en seis genogrupos distintos (GI-GVI) basados en el árbol filogenético inferido por la comparación de la secuencia peptídica completa de VP1. En particular, los genogrupos GI, GII y GIV infectan a los seres humanos. Además, los genogrupos se dividen en genotipos definidos en base a las secuencias de la RNA polimerasa y/o de la proteína de la cápside VP1. Hasta la fecha, en base al análisis filogenético de la secuencia de la cápside se han reconocido nueve genotipos en el genogrupo GI y veintidós en el GII, y solamente se han detectado tres genotipos del GII (GII.11, GII.18 y GII.19) en cerdos. Entre ellos, GII.4 es responsable de la mayoría de los brotes de norovirus en todo el mundo.

Tras un período de incubación de 12 a 48 h, la enfermedad causada por norovirus se caracteriza por vómitos en proyectil, diarrea sin sangre, náuseas, calambres abdominales y fiebre de bajo grado. Los norovirus pueden infectar a los humanos a través de múltiples vías, incluyendo la vía oral, transmitida a través del contacto con la materia fecal o por aerosolización de los vómitos de las personas infectadas, así como las superficies contaminadas, los alimentos o el agua.

El genoma de norovirus consiste en un RNA monocatenario de sentido positivo de 7.5-kb que contiene tres marcos de lectura abierta (ORFs). El ORF1 codifica un polipéptido de seis proteínas no estructurales, incluyendo la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp), el ORF2 codifica la proteína principal de la cápside, VP1, mientras que el ORF3 codifica la proteína estructural menor de la cápside, VP2. La mayoría de los ensayos de RT-PCR en tiempo real para norovirus GI y GII van dirigidos a región de unión de la RNA polimerasa y la cápside (ORF1-ORF2 *junction*), que es la región del genoma de norovirus más altamente conservada.

3. Procedimiento

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de gastroenteritis causada por Norovirus GII en muestras de heces humanas. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la

retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de Norovirus GII se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda fluorescente marcada que hibridan con una región diana conservada de la zona de unión ORF1-ORF2.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de la secuencia diana hidrolizada. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la amplificación de las secuencias diana de RNA de Norovirus GII y del control interno, Norovirus GII se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-NOP1SL/ VS-NOP1SH	<i>Norovirus GII</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 X 8-pocillos en tiras
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-NOR1C	<i>Norovirus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAse/DNAse	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 X 8-tapones para tiras

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-NOP106L, VS-NOP106H, VS-NOP112L, VS-NOP112H.



Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-NOP1PL/ VS-NOP1PH	<i>Norovirus GII</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-NOR1C	<i>Norovirus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 X 8-tapones para tiras

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-NOP113L y VS-NOP113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I)
- Kit de extracción de RNA
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (0.5-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte puede realizarse de 2-30°C durante 2 semanas máximo.
- Almacenar el kit en nevera entre 2-8°C.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.

- Diseñar un flujo de proceso unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas 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.

8. Procedimiento del test

8.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C . En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Se recomienda diluir la muestra de heces antes de la extracción. Para ello, se debe tomar una muestra de heces del tamaño de un guisante (aprox. 8mm) y colocarla en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contiene 100 μL de suero fisiológico o PBS. Posteriormente, vortear intensamente y centrifugar a 10,000 rpm durante 1min. Finalmente, utilizar 200 μL del sobrenadante para realizar la extracción de RNA.

8.1.1. EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA a partir de muestras de heces humanas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante, si bien, los siguientes kits de extracción han sido validados:

- VIASURE RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- UltraClean® Tissue & Cells DNA/RNA Isolation Kit (Mobio).
- NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

El vial de *Norovirus GII* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Norovirus GII* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. PROTOCOLO PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Norovirus GII* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente. Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la retrotranscriptasa	15 min	45°C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Recogida de datos*	50 seg	60°C

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Norovirus GII) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Norovirus GII*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

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.

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

Norovirus GII	Control interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Norovirus GII Positivo
-	+	-	+	Norovirus GII Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

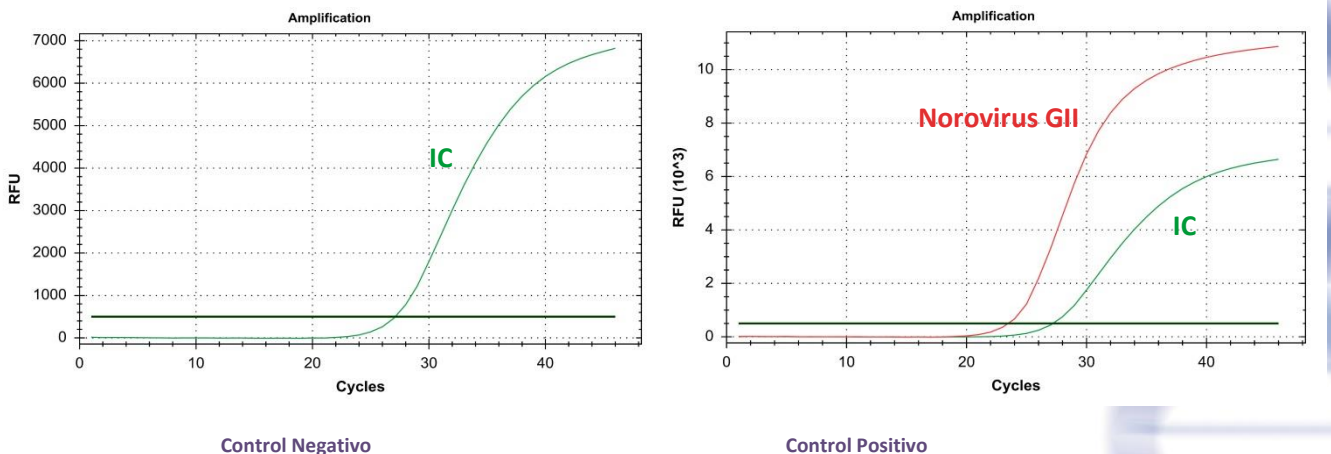
-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra una gráfica de amplificación.

Una muestra se considera como positiva, si la muestra presenta una señal de amplificación y el valor Ct es menor de 40, aunque el control interno sea negativo. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo. En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras fecales humanas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras fecales humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias del 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 Norovirus GII, 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.

11. Control de calidad

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLINICA

La evaluación con muestras fecales de pacientes sintomáticos fue probada utilizando VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RIDA®GENE *Norovirus I&II* (r-Biopharm)).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE <i>Norovirus GII</i> Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE <i>Norovirus I&II</i> (r-Biopharm)			Total
		+	-	
+	60	2*#	62	
-	0	43	43	
Total	60	45	105	

Tabla 5. Comparativa de resultados

*La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado, por lo que se pueden producir resultados positivos aleatorios.

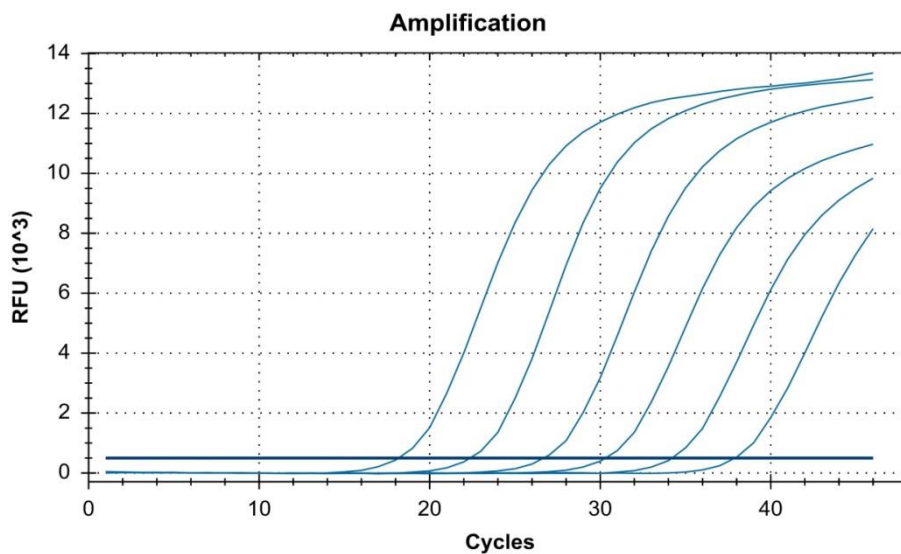
#Por otro lado, estas dos muestras han sido evaluadas por RT-PCR convencional y posteriormente secuenciadas, confirmando nuestros resultados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Norovirus GII utilizando VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 100 copias de RNA viral por reacción (Figura 2).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de Norovirus GII (10^7 - 10^2 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de Norovirus GII fue confirmada probando un panel compuesto por 45 microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit no identifica las siguientes cepas, por lo que no se generan falsos positivos, confirmándose así la exclusividad del ensayo.

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

Tabla 6. Microorganismos patógenos y no patógenos de referencia utilizados en este estudio.










12.2. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a los genotipos de Norovirus GII GII.1, GII.2, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.Pe y GII.Pg, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Fuentes *et al.* Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. *Food Microbiology* 2014; 40: 55-63.
2. T. Kageyama *et al.* Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(4): 1548-1557.
3. N. Jothikumar *et al.* Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(4): 1870-1875.
4. J. Vinjé. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology* 2015; 53(2): 373-381.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

 IVD	<i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra		Catalogue number Número de referencia

ANEXO 1:

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler®480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System

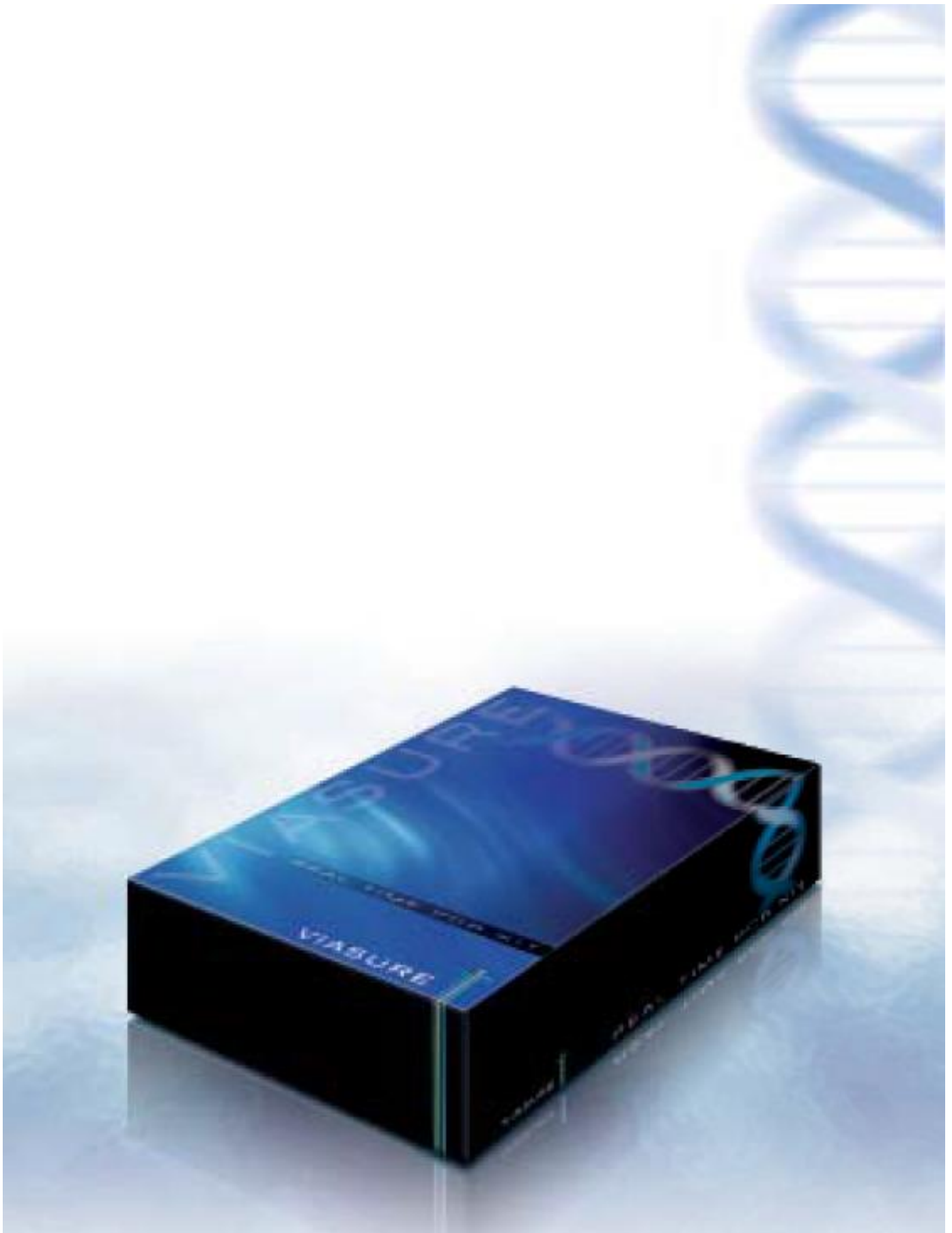
Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System and AriaMx Real-Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System and AriaMx Real-Time PCR System. Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

- 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™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.



21 *Norovirus GII* Real Time PCR Detection Kit





CERTEST BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

www.certest.es

