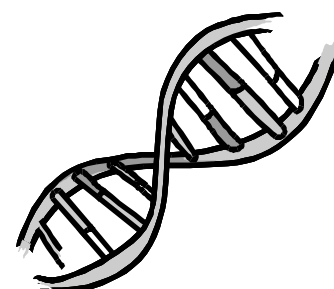


MutaPLEX[®] Norovirus *real time* RT-PCR Kit



Version 03-2011: *geänderte* Enzymmengen **beachten!**

Qualitativer Test zum spezifischen Nachweis von **Noroviren** (Genogruppe I und II) in offenen *real time* PCR - Systemen (z. B. von Applied Biosystems, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: SmartCycler, Stratagene: Mx3500, Amplifa: ECO, sowie LightCycler 480, Roche*) und gleichzeitiger Überprüfung der RNA-Extraktionseffizienz aus Stuhlproben.

REF KG190132 

REF KG190196 



* MutaPLEX[®] Norovirus ist **lizenziert** von Roche Molecular Systems, Inc.

Nur für in vitro Diagnostik



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com

Tel.: +49 (0)6251/ 701900
 Fax: +49 (0)6251/ 849430



1. VERWENDUNGSZWECK

Das **MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR** - Kit ist ein qualitativer Test (Quantifizierung *optional*) zum spezifischen Nachweis von Noroviren (Genogruppe I und II) in Stuhlproben mittels offenen *real time* RT-PCR- Systemen (z.B. von Applied Biosystems, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: SmartCycler, Stratagene: Mx3500, Amplifa: ECO) sowie dem LightCycler 480 (Roche). Gleichzeitig ist eine Überprüfung der RNA-Extraktionseffizienz über eine separate interne PCR-Kontrolle möglich. Der Test wird unter der **Lizenz** von **Roche Molecular Systems, Inc.** in Verkehr gebracht.

2. EINLEITUNG

Die umgangssprachlich als „Magen-Darm-Grippe“ bezeichnete virale Gastroenteritis wird in der Mehrzahl durch die Spezies der humanpathogenen Noroviren (NV) verursacht. Bei diesen hoch infektiösen Viren, die zur Familie der **Caliciviridae** gehören, handelt es sich um kleine (ca. 30 nm) unbehüllte RNA-Viren. Sie sind sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen und überstehen z.B. Temperaturen zwischen -20°C und +60°C, saure Umgebungen bis pH 3 sowie Chloritkonzentrationen bis 10 µg/ml. NV-Infektionen können das ganze Jahr über auftreten, jedoch kommt es in Mitteleuropa zwischen Oktober und März zu einem saisonalen Anstieg der Fälle.

Die Übertragung von NV erfolgt **direkt** von Mensch zu Mensch über Kontakt-/ Schmierinfektion oder auch **indirekt** über kontaminierte Lebensmittel/ Wasser. Bereits eine sehr geringe Anzahl von NV-Partikeln reicht aus, um eine epidemieartige Infektion auszulösen. Daher sind geschlossene Einrichtungen wie Krankenhäuser, Seniorenheime, Kindergärten, Sportstätten, Kreuzfahrtschiffe oder sonstigen Gemeinschaftseinrichtungen besonders häufig betroffen. Nachweislich infizierte Personen (Meldepflicht an RKI beachten!) müssen entsprechend mehrere Tage isoliert werden.

Die humanpathogenen Noroviren weisen zudem eine hohe genetische Variabilität auf und werden aufgrund dessen nochmals in unterschiedliche Genogruppen unterteilt. **MutaPLEX® Norovirus** wird jedoch routinemäßig anhand verschiedener Sequenzdatenbanken aktualisiert und erkennt daher selbst Stämme mit großer genetischer Diversität, so zum Beispiel:

GGI: *Norwalk, Southampton, Queens Arms, Desert Shield, Winchester, Sindleshm, Chiba*

GGII: *Lordsdale, Melksham, Hawaii, Mexico, Leeds, Hillingdon, Snow Mountain, Toronto, Bristol*

3. TESTPRINZIP

Das **MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR** - Kit enthält spezifische Primer, Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonden und weitere Reagenzien zur spezifischen Detektion von Noroviren der Genogruppen I und II. Menschliche Stuhlproben können als Ausgangsmaterial für die RNA-Gewinnung des Erregers dienen und entsprechend für die Austestung mit **MutaPLEX® Norovirus** verwendet werden.

Die **reverse Transkription (RT)** der potentiell enthaltenen viralen RNA zu cDNA und die anschließende Amplifikation Norovirus-spezifischer Fragmente mittels Polymerase Chain Reaction erfolgt in einem Ansatz (one-step RT-PCR). Die Zielsequenz zur Detektion des **Norovirus** (GG I bzw. II) ist die Region innerhalb der **ORF1/ ORF 2- junction**.

Die Detektion der NV-Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch Hybridisierung und anschließender Hydrolyse Norovirus-spezifischer Fluoreszenz-Sonden, deren emittiertes Signal von der optischen Einheit des verwendeten *real time* PCR Systems (ABI: PRISM SDS-, Stratagene: MxPRO-, Corbett Research: RotorGene 3000/ 6000- Software) detektiert wird. Diese **Norovirus-spezifische Amplifikation** erfolgt im **FAM-Kanal (470/ 510 nm)**.

Zusätzlich verfügt **MutaPLEX® Norovirus** über eine separate RNA-Extraktionskontrolle, die vor der Nukleinsäureisolierung zugefügt und dann in einem 2. heterologen Amplifikationssystem nachweisbar wird. Diese interne Kontrollreaktion (IC) ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der RNA-Extraktion, zum andern die Identifikation einer möglichen Inhibition der Reversen Transkription bzw. PCR: Das Risiko Falsch-Negativer Ergebnisse wird dadurch deutlich minimiert!

Die Detektion dieser amplifizierten separaten **RNA-Extraktionskontrolle** (= interne PCR-Kontrolle IC) erfolgt im **VIC** (bzw. = **HEX / JOE / TET / Cy3**) – Kanal (**530/ 555 nm**).

4. KITBESTANDTEILE

Jedes Testkit enthält Reagenzien zur Durchführung von **32** bzw. **96** Bestimmungen, sowie eine Gebrauchsanleitung, die stets auf das **aktuelle Datum** hin zu überprüfen und für die Abarbeitung der vorliegenden Reagenzien zu verwenden ist!

Code	Reagenz	Konfektion 32	Konfektion 96	Deckelfarbe
A1	Enzym Mix	1x 18 µl	1x 50 µl	blau
A2	Primer-/ Sonden Mix	1 x 470 µl	2 x 700 µl	gelb
A3	Positivkontrolle (1x 10 ⁵ Kopien/ µl)	1 x 50 µl	2 x 50 µl	rot
A4	Negativkontrolle	1 x 50 µl	2 x 50 µl	grün
A5	Extraktionskontrolle (IC)	1 x 160 µl	3 x 160 µl	transparent

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Benötigte Materialien - mitgeliefert:

- Reagenzien für die *real time* RT-PCR
- Gebrauchsanweisung

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

- *real time* PCR-Instrument (z.B. von ABI, Stratagene: Mx3500, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: SmartCycler, Amplifa: ECO oder Roche: LightCycler 480)
- PCR-Reaktionsgefäße (oder für bestimmte Systeme auch optische Mikrotiterplatten mit transparenter Abdeckfolie)
- Tischzentrifuge (bis 13000 rpm)
- Kryobehälter für PCR-Reaktionsgefäße
- RNA-Extraktionskit für Stuhlproben (**MutaCLEAN[®] Stool (vRNA)**, KG1035, Immundiagnostik)
- Pipetten (0,5 – 200 µl)
- sterile Filterspitzen für Mikropipetten
- sterile Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2,0 ml)

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Alle Reagenzien (A1 bis A4) **bis zum unmittelbaren Gebrauch bei <-20°C** lagern.
- Reagenzien **A2, A3** und **A5 unbedingt** nicht mehr als **3x auftauen** (bei Bedarf nach dem erstmaligem Auftauen **geeignete Aliquots** herstellen und dann **sofort** wieder einfrieren).
- Während der PCR-Vorbereitung alle Arbeitsschritte **zügig** und **gekühlt** durchführen (z.B. auf Eis arbeiten oder einen Kryobehälter (wie z.B. Light Cycler[®] Cooling Block) verwenden).
- Primer-/ Sonden-Mix (**A2**) stets vor **Licht schützen** (also im Dunkeln aufbewahren).
- Alle Reagenzien können bis zum Ablauf des (auf der Kit-Packung angegebenen) Mindesthaltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- **MutaPLEX® Norovirus** ist **Roche-lizenziert**, d. h. es sind **keine** weiteren Gebühren (z.B. für „reported-results“) mehr erforderlich.
- Test nur mit speziell in Molekularbiologie-Techniken geschultem Personal durchführen.
- Die klinischen Proben als potentiell infektiöses Material ansehen; entsprechend entsorgen!
- Die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) müssen eingehalten werden.
- Testkit nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatum nicht mehr verwenden.

AMPLIFIKATION: Die PCR-Technologie ist sehr sensitiv, d. h. die Vermehrung eines einzelnen Moleküls generiert Millionen identischer Kopien. Diese Kopien können in Form von Aerosolen entweichen und sich auf Unterlagen in der Umgebung festsetzen. Um eine Kontamination von Proben mit Amplifikaten aus vorausgegangenen Experimenten zu vermeiden, sollte in drei (möglichst auch räumlich) von einander getrennten Bereichen gearbeitet werden und zwar:

- 1) Bereich, in dem die Proben vorbereitet werden.
- 2) Bereich, in dem der Master-Mix angesetzt wird.
- 3) Bereich, in dem der Master-Mix und Proben-RNA in PCR-Gefäße pipettiert werden.

Pipetten, Reaktionsgefäße und andere Arbeitsmittel nicht innerhalb dieser drei verschiedenen Arbeitsbereiche austauschen.

- Sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzen.
- Für jeden Arbeitsplatz neue Handschuhe benutzen und Kittel tragen.
- Aerosolbildung vermeiden.
- Regelmäßig Pipetten und Laborbänke dekontaminieren (keine ethanolhaltige Lösungen).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Die gesamte Durchführung ist in folgende drei Schritte aufgeteilt:

- A) RNA-Extraktion aus Stuhlproben (**MutaCLEAN® Stool (vRNA)**, KG1035, Immundiagnostik).
- B) Reverse Transkription der RNA und nachfolgende Amplifikation/ kombinierte Detektion der entstandenen cDNA-Templates mittels der Hybridisierungssonden.
- C) Interpretation der Ergebnisse mit der Software des verwendeten *real time* PCR-Systems.

A) RNA-EXTRAKTION

- 1) Die Extraktion viraler RNA wird mit Hilfe des **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1035, **Immundiagnostik** aus Stuhlproben durchgeführt und erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu eine „erbsengroße“ Stuhlprobe mit **1 ml Reinstwasser** (keine Puffer verwenden!) aufschwemmen, vortexen und nach Absinken der festen Bestandteile (ggf. 1 min bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren) den Überstand als Ausgangsmaterial verwenden. Sehr flüssige Stuhlproben können direkt (also ohne weitere Aufschwemmung) zur Extraktion eingesetzt werden: dann ebenfalls zuerst gut vortexen und wiederum nach Absinken aller festen Bestandteile (ggf. 1 min bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren) den Überstand unverdünnt verwenden.
- 2) **Wichtig:** Zusätzlich zu den Proben sollte eine Wasserkontrolle mit extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende inhibitorische Matrixeffekte ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Stuhlprobe behandelt werden.
- 3) Die im **MutaPLEX® Norovirus**-Kit mitgelieferte Extraktionskontrolle (A5) wird jeder Probe VOR der eigentlichen Extraktion beigemischt: Dazu zunächst eine „working solution“ aus dem ersten Puffer des RNA-Isolierungs-Kits (plus eventuelle Zusätze wie „Poly A“) und der Extraktionskontrolle (A5) herstellen, indem das für jeweils eine Extraktion benötigte Puffervolumen (bei **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**: 200 µl) mit der Anzahl (N) der insgesamt durchzuführenden Extraktionen multipliziert wird (dabei Wasserkontrolle nicht vergessen und zum Ausgleich der

Pipettierungenauigkeit zusätzlichen „virtuellen“ Ansatz mit berechnen!) und von der Extraktionskontrolle je noch **5 µl** pro Ansatz hinzu pipettiert werden, also pro Probe [für Extraktionskit benötigte Puffermenge + 5 µl A5] x [N+1]. Anschließend mit dieser „working solution“ dann die Extraktion laut Herstellerangaben durchführen.

OPTIONAL: Wird keine Kontrolle der Extraktions-Effizienz gewünscht, dann kann A5 auch direkt als interne Kontrolle (IC) dem PCR-Master Mix zugesetzt werden – in dem Fall werden lediglich **0,5 µl / Probe** eingesetzt!

- 2) Falls die *real time* PCR nicht sofort durchgeführt wird, die Proben bei **< -20°C** aufbewahren.

B) MutaPLEX® Norovirus *real time* RT-PCR PROTOKOLL

Das Protokoll vollständig lesen **bevor** mit der Durchführung begonnen wird! Die für den Gesamtansatz notwendige Master-Mix - Menge wird wie folgt (s. auch Tabelle) ermittelt:

- 1) Die für das gesamte Experiment notwendige Anzahl (N) an Reaktionen (= klinische Proben und Kontrollen) mit den jeweils für eine PCR-Reaktion notwendigen Aliquotmengen multiplizieren und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit ca. 10 % zusätzlich berechnen.

Alle Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen!

Einzel-PCR-Volumen	Master-Mix Volumen
0,5 µl Enzym-Mix (A1)	0,5 µl x N (+ 10%)
14,5 µl Primer-/ Sonden-Mix (A2)	14,5 µl x N (+ 10%)

- 2) Die Reagenzien (Enzym, A1 und Primer-/ Sonden-Mix, A2) in einem sterilen Reaktionsgefäß vorsichtig durch **mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (ca. 15 – 20 x) gut mischen (NICHT VORTEXEN !)**: Diese Mischung stellt den Master-Mix dar - diesen kurz in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln!
- 3) **15 µl** dieses Master-Mix in jedes der benötigten PCR-Gefäße vorlegen und danach in das jeweils korrespondierende PCR-Gefäß **5 µl** der Proben-RNA bzw. der Positiv- (A3), Negativ-(A4) und der mit extrahierten Wasserkontrolle zugeben und wiederum durch auf- und abpipettieren mischen. Es empfiehlt sich die PCR-Gefäße jeweils unverzüglich nach Befüllung zu verschließen und die Negativkontrolle als Kontaminationskontrolle zwar zuerst zu pipettieren, jedoch als letzte zu verschließen.
- 4) Bei Verwendung optischer 96 well-Mikrotiterplatten als PCR-Gefäße diese unmittelbar nach dem Befüllen mit transparenter Abdeckfolie abkleben und nach kurzem Abzentrifugieren (um alle Flüssigkeiten gleichmäßig am Boden der Vertiefungen zu sammeln) in das *real time* PCR – Mikrotiterplattensystem überführen.

- 5) Folgendes ***real time* RT- PCR** Protokoll durchführen:

50°C für **10 min** (reverse Transkription)

95°C für **10 min**

40 Zyklen: (Amplifikation)

95°C für **15 sec**

60°C für **30 sec**

72°C für **20 sec**

Messung am Ende dieses **Annealing**-Schritts durchführen.

(für **ABI 7000**-Instrument hier **30 sec** wählen + passive Referenz auf „none“ !)

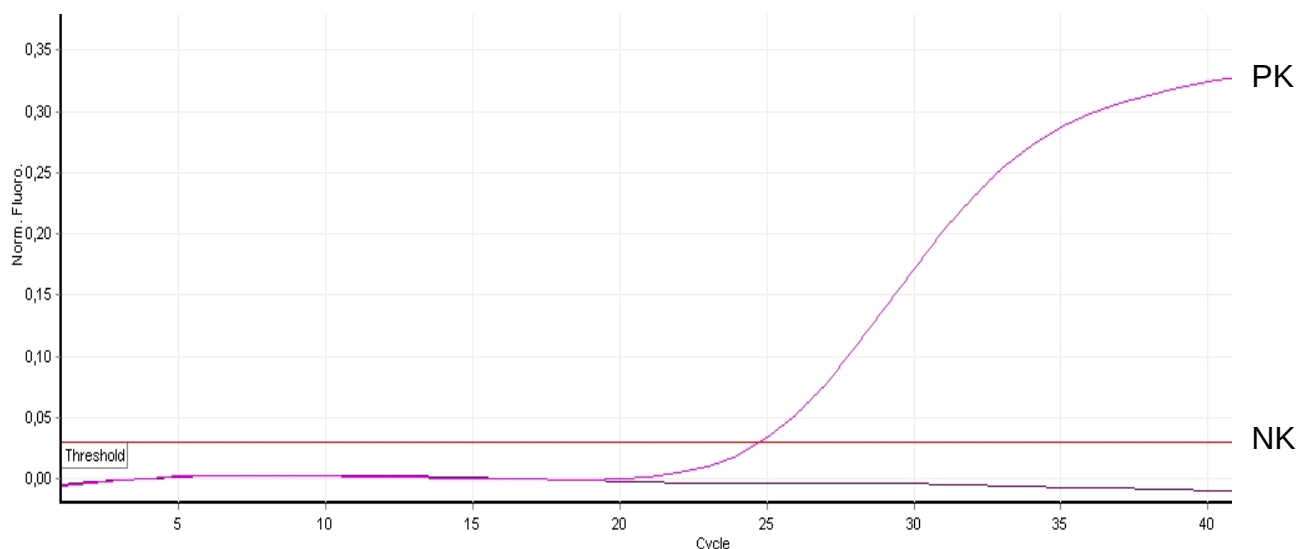
C) RT-PCR ANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- 1) Durchführung der *real time* RT- PCR.
- 2) Das Ergebnis der Norovirus-spezifischen Amplifikation wird im **grünen FAM-Kanal** (Source **470/** Detector **510 nm**) angezeigt, das Signal der **Extraktionskontrolle** (= interne Kontrolle, **IC**) im **gelben VIC** (bzw. **HEX/ JOE/ TET/ Cy3**)- Kanal (Source **530/** Detector **555 nm**), d. h. folgende Einstellungen sollten im verwendeten *real time* PCR- Instrument eingestellt sein:

Detection	Reporter	Quencher
Norovirus RNA: 510 nm	FAM	none
Extraktionskontrolle (= IC): 555 nm	VIC (HEX/ JOE/ TET/ Cy3)	none

Folgende Resultate sind möglich:

- 1) Detektion eines Signals im **FAM**-Kanal: Ergebnis ist **positiv**, Probe **enthält Norovirus-RNA**.
In diesem Fall ist die Detektion der VIC (bzw. HEX/ JOE/ TET/ Cy3)- Fluoreszenz nicht notwendig, da hohe *Norovirus* cDNA- Konzentrationen zu vermindertem bzw. fehlendem Fluoreszenz-Signal der IC führen kann (Kompetition).
- 2) Es wird **kein** Signal im **FAM**-Kanal detektiert, jedoch im **VIC** (bzw. HEX/ JOE/ TET/ Cy3)- Kanal (= Signal der IC): Ergebnis ist **negativ**, die Probe enthält **keine Norovirus-RNA**.
Das detektierte Signal der internen Kontrolle schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften RNA-Extraktion sowie einer Inhibition der reversen Transkription + PCR aus (die Negativkontrolle enthält keine IC, d.h. sie ist der einzige Ansatz, bei dem beide Kanäle negativ sind).
- 3) Es wird **kein** Signal im **FAM**- und **kein** Signal im **VIC** (bzw. HEX/ JOE/ TET/ Cy3)- Kanal detektiert: **Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden**.
Die *real time* RT-PCR-Reaktion wurde **inhibiert** bzw. Fehler bei der RNA-Extraktion.

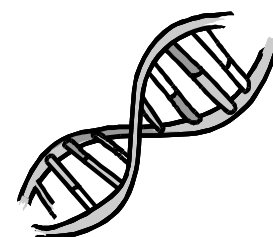


Anmerkung:

- Die Konzentration der **PK** ist **1x10⁵ Kopien/ µl** (also 500000 Kopien in der PCR) und generiert Amplifikationssignale ab **ct-Wert 24** (+ /- 1). Für quantitative Untersuchungen gilt zu beachten, dass jede 1:10-Verdünnung der PK in einer (logarithmischen) ct-Wert - Erhöhung um genau 3,3 Einheiten resultiert.
- Die **Sensitivität** der PCR beträgt ca. **1 - 5 Kopien/ PCR-Ansatz** (also **0,2 - 1 Kopie/ µl**).

MutaPLEX[®] Norovirus

real time RT-PCR Kit



Version 03-2011: please consider *modified* enzyme amounts!

Qualitative assay for specific detection of **Norovirus** (GG I, II) using open (e.g. microtiterplate) *real time* PCR systems (e. g. Applied Biosystems ABI, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: Smart Cycler, Stratagene or LightCycler 480, Roche*) and parallel control of RNA extraction efficiency from stool samples.

REF KG190132 

REF KG190196 



* MutaPLEX[®] Norovirus is **licensed** from Roche Molecular Systems, Inc.

For in vitro diagnostic use only



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany
www.immundiagnostik.com
info@immundiagnostik.com

Tel.: +49 (0)6251/ 701900
 Fax: +49 (0)6251/ 849430



1. INTENDED USE

The **MutaPLEX® Norovirus** *real time* RT-PCR kit is a qualitative assay for the specific detection of Norovirus (GG I and II) in stool samples using open real time RT-PCR systems (e.g. from ABI, Stratagene, Corbett Research: RotorGene, Cepheid: Smart Cyclor, or Light Cyclor480 (Roche)). In parallel, the RNA extraction efficiency from stool samples is controlled by a separate internal control. The kit is **licensed** from **Roche Molecular Systems, Inc.**.

2. INTRODUCTION

Non-bacterial **Gastroenteritis** is mainly caused by species of human-pathogen noroviruses. These high infectious viruses have a non-enveloped RNA genome and belong to the family of **Caliciviridae**. They are resistant against environmental influences, e.g. against temperatures between -20°C and +60°C, acids (pH3) and chlorite (10mg/ L). NV infections may occur the whole year but in Europe a seasonal increase from October - March is typical. NV trans-mission happens **direct** from person to person by contact-/ smear-infection or also **indirect** by contaminated food or water. Already a low dose of NV particles is sufficient to release epidemic infections. Therefore especially closed environments (hospitals, elderly homes, kindergartens, sport-courts, cruise-ships etc.) are affected. Positive tested persons have to be registered (RKI) and isolated for several days.

Due to their high genetic variability, human-pathogen NV is subdivided in different geno-groups/ genotypes. But because **MutaPLEX® Norovirus** reagents are routine up-dated using different sequence data bases, they recognize even strains from high genetic diversity, e.g.:

GGI: Norwalk, Southampton, Queens Arms, Desert Shield, Winchester, Sindlesham, Chiba

GGII: Lordsdale, Melksham, Hawaii, Mexico, Leeds, Hillingdon, Snow Mountain, Toronto, Bristol

3. PRINCIPLE OF THE TEST

MutaPLEX® Norovirus *real time* RT-PCR kit contains specific primers, fluorescence-marked probes and additional material for the detection of Norovirus (genogroup I and II). Human stool samples may be used as starting material for RNA-extraction and following pathogen analysis with **MutaPLEX® Norovirus**.

Reverse transcription (RT) of potentially contained viral RNA to cDNA and subsequent amplification of norovirus-specific fragments by means of PCR is done in only **one step**. **Target sequence** for the detection is the region in the **ORF1 / ORF2 - junction**.

Detection of NV amplicates is achieved in *real time* by hybridization and hydrolysis of NV-specific fluorescence probes. Their emitted signal is measured (during PCR process) by the optical unit of the *real time* PCR system in use (ABI: PRISM SDS-, Stratagene: MxPRO-, Corbett Research: RotorGene 3000/ 6000-, Cepheid: SmartCycler- Software, Roche: LC480- software). **Norovirus-specific amplification** is measured in **FAM**-channel (**470/ 510** nm).

Furthermore, **MutaPLEX® Norovirus** *real time* RT-PCR - kit contains also a separate RNA extraction control. This is added initially prior the nucleic acid extraction procedure and detected in the follow-up by an independent amplification step. This internal control (IC) allows on the one hand the exposure of errors during RNA extraction procedure and identifies on the other hand a potential inhibition of reverse transcription or PCR. Doing this, the risk for false-negative results is minimized extensively. **RNA extraction control** (= internal control for PCR) is measured in **VIC**- (resp. = **HEX/ JOE/ TET/ Cy3**) channel (**530/ 555** nm).

4. KIT CONTENT

Each kit contains enough reagents to perform 32 or 96 tests and also a package insert.

	Reagent	Confection 32	Confection 96	Colour
A1	Enzyme Mix	1x 18 µl	1x 50 µl	blue
A2	Primer-/ Probe Mix	1 x 470 µl	2 x 700 µl	yellow
A3	Positive Control	1 x 50 µl	2 x 50 µl	red
A4	Negative Control	1 x 50 µl	2 x 50 µl	green
A5	Extraction Control (IC)	1 x 160 µl	3 x 160 µl	transparent

5. TEST PERFORMANCE

Required materials - provided:

- Reagents for *real time* RT-PCR
- Package insert

Required materials - not provided:

- *Real time* PCR instrument (e.g. from ABI, Stratagene, Corbett Research: Rotor Gene, Cepheid: Smart Cyclyer or Roche: Light Cyclyer 480)
- PCR reaction tubes (or optical microtiter plates with transparent optical covers)
- Table centrifuge (13000 rpm) and Cry- container for PCR tubes
- RNA extraction kit for stool samples (e.g. MutaCLEAN[®] Stool (Viral RNA), KG1035, Immundiagnostik)
- Pipets (0.5 µl – 1000 µl) with sterile filter tips
- sterile reaction tubes (1,5 ml and 2,0 ml)

6. STORAGE AND HANDLING

- All reagents (A1 to A5) should be stored **till immediate use** at **<-20°C**.
- **Avoid several freeze/ thawing cycles** for reagents A2, A3 and A5 (in case of sporadic use prepare **suited aliquots**).
- **Cool** all reagents during the working steps.
- Store Primer-/ Probe-Mix (A2) in the dark to **protect** the fluorescence probes **from light**.
- All reagents can be used until the expiration date printed on the labels.

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- **MutaPLEX[®] Norovirus** is **Roche-licensed**, no fees for “reported-results” necessary.
- This assay needs to be carried out by in Molecular Biology methods skilled personnel.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials.
- This assay needs to be run according to GLP (Good Laboratory Practice).
- Do not use the kit after its expiration date.

AMPLIFICATION: The PCR technology is utmost sensitive. Thus, amplification of a single molecule generates millions of identical copies. These copies may evade through aerosols and sit on surfaces. In order to avoid contamination of samples with RNA which previously was amplified, it is important to physically strictly divide sample and reagent preparation units from sample amplification units. Set up two separate working areas:

- 1) Aerea for sample preparation.
- 2) Aerea for preparation of Master Mix.
- 3) Aerea for pipetting Master Mix and samples to the PCR tubes.

Pipets, vials and other working materials should not circulate among working units!

- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Avoid aerosols.
- Routinely decontaminate your pipettes and laboratory benches with decontaminant (do not use ethanol solutions).

8. PROCEDURE

The complete procedure is separated in three steps:

- A) RNA extraction from stool samples (e.g. with **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1034 from **Immundiagnostik**).
- B) reverse transcription of RNA and subsequent amplification/ combined detection of generated cDNA templates using hybridisation probes.
- C) Interpretation of the results with the software of the real time PCR instrument in use.

A) RNA EXTRACTION

- 1) extraction of viral RNA is done with a **commercial** available RNA isolation kit (e. g. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1035 from **Immundiagnostik**) from clinical stool samples according to the manufacturer`s instructions.
For doing this, resuspend a “pea-sized” stool sample in 1,0 ml **pure water** (do **not** use buffers!) by intensive vortexing and let sediment solid particles (if necessary support by centrifugation for 2 min at 5000 rpm in table centrifuge). Use the supernatant for RNA extraction without any further dilution. Very liquid stool samples should be used directly (without further resuspension) for the RNA extraction, but also here vortex intensively and proceed as before described.
- 2) **Important: Additional** to the samples should be extracted also a water control which is for identification of eventually occurrence of inhibiting matrix effects. Treat this water control analogous to the samples.
- 3) Extraction control (A5) in the **MutaPLEX® Norovirus – Kit** is added to each sample **BEFORE** begin of the extraction procedure: Prepare a “working solution” with the first buffer of the used RNA isolation kit (eventually plus supplements as „Poly A“) and the extraction control (A5). Multiply the buffer volume necessary for one extraction (this is 500 µl for **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)** from **Immundiagnostik**) with number (n) of extractions performed in total (do not forget the water control and add also one virtual extra volume for reasons of unprecise pipetting) and add for each extraction 5µl of A5:
$$= [\text{extraction buffer volume} + 5\mu\text{l A5}] \times [n+1]$$

Perform with that “working solution” the extraction procedure according to the manufacturer`s manual.
OPTIONAL: If no control of extraction efficiency is needed, the reagent A5 may be used also directly in the PCR Master Mix as internal control (IC). In that case use 0.5 µl per reaction!

- 4) If *real time* RT-PCR is not performed immediately, store the extracted RNA according to the manufacturer`s recommendation (normally at < -20°C).

B) *Real time* Norovirus (MutaPLEX®) RT-PCR-PROTOCOL

Please **read** carefully the complete protocol **before** starting procedure! Each assay should include a negative and positive control. Use filter tips for all pipetting steps. The necessary total Master Mix volume is calculated as follows:

- 1) Multiply Enzyme Mix volume per reaction with the number (n) of necessary reactions (samples and controls) + add one extra virtual volume for reasons of unprecise pipetting; proceed in the same manner with all additional reagents!

Cool all reagents during the working steps!

For **PCR Master Mix** preparation combine the following reagents in a sterile tube and mix gently by pipetting (about **15 - 20x ! - do NOT vortex!**):

Reaction Volume	Master Mix Volume
0.5 µl Enzyme Mix (A1)	0.5 µl x (n+1)
14.5 µl Primer-/ Probe Mix (A2)	14.5 µl x (n+1)

- 3) Pipet **15 µl** of this Master Mix using micropipets with sterile filter tips in each of necessary PCR reaction tubes (or wells of an optical 96 well microtiter plate); do not forget the controls.

Add **5 µl** of sample RNA (or positive/ negative/ water control) to each corresponding PCR reaction tube. Mix by pipetting several times up and down. It is recommended to close the tubes immediately after filling and to prepare the negative control indeed first but to close at last (as contamination control). In case optical microtiter plates are used, cover the used wells with an optical adhesive foil.

- 4) Transfer the reaction tubes into the *real time* PCR system and run the RT-PCR using following temperature protocol:

50°C for **10 min** (reverse transcription)

95°C for **10 min**

40 cycles: (amplification)

95°C for **15 sec**

60°C for **30 sec** **measurement** at end of this **annealing** step

72°C for **20 sec** (for **ABI 7000** instrument select here **30 sec** + passive reference: **none**)

C) RT-PCR ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

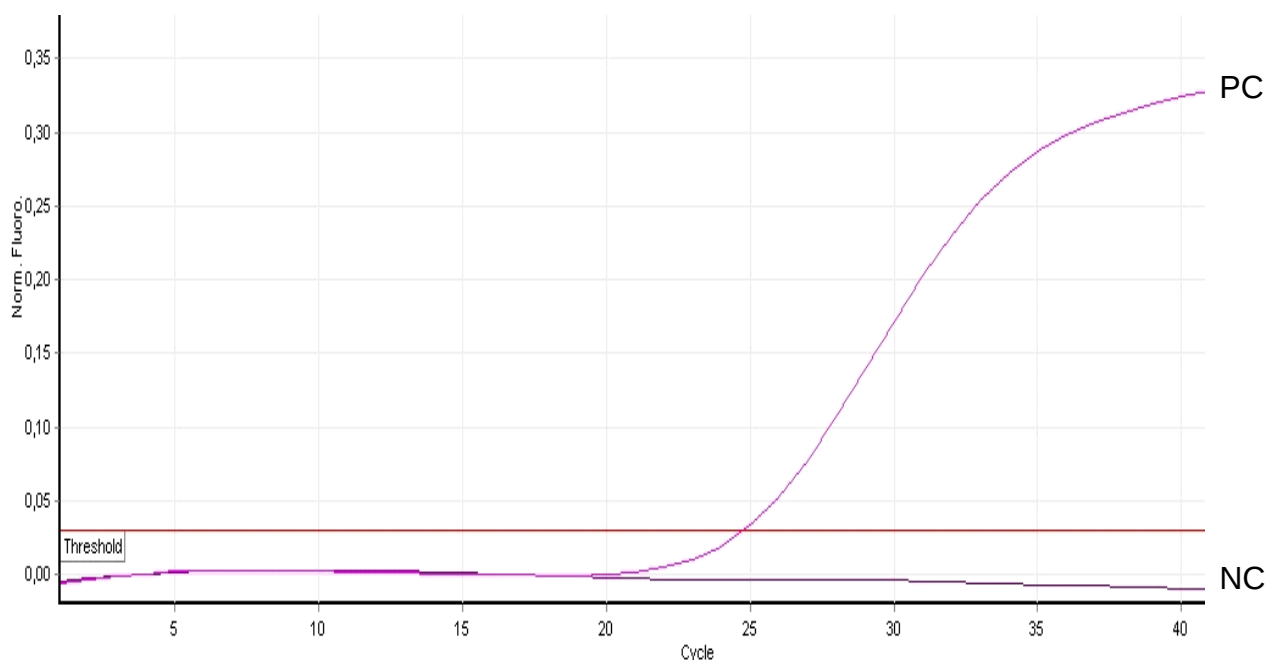
- 1) Performance of *real time* RT-PCR with **MutaPLEX® Norovirus**.
- 2) The result of norovirus specific amplification is shown in the **FAM**-channel (source 470 nm/ detection **510 nm**) and the result of the extraction efficiency control (= internal control **IC**) is shown in **VIC**- (= HEX/ JOE/ TET/ Cy3) channel (source 530 nm/ detection **555 nm**).

3) Use following settings to define a reporter + quencher with the ABI PRISM SDS software:

Detection	Reporter	Quencher
Norovirus RNA	FAM	none
Internal Control	VIC / HEX / JOE	none

Following results can arise:

- 1) FAM fluorescence is detected.
The result is positive: **The sample contains Norovirus RNA.**
The occurrence of VIC/ HEX/ JOE/ TET/ Cy3 fluorescence is inessential as high concentrations of *Norovirus* RNA may reduce or even inhibit the amplification of the internal control.
- 2) No FAM, but VIC / HEX / JOE fluorescence is detected.
The result is negative: **The sample does not contain any Norovirus RNA.**
The detected signal of the internal control excludes the possibility of an inhibition of the RT-PCR.
- 3) Neither FAM, nor VIC / HEX / JOE fluorescence is detected.
A diagnostic statement can not be made.
An **inhibition** of the RT-PCR reaction occurred.



Note:

- PC is concentrated with about 100.000 copies/ μ l (means 500.000 in PCR) and generates amplification signals with ct-value 24 – 25 (+/- 1). Each 1:10 – dilution results in a (logarithmic) ct-value increase of 3.3 units.
- Sensitivity of the PCR is about 1 – 5 copies/ μ l.