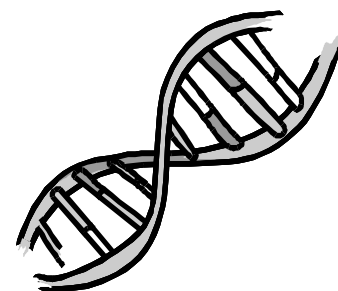


MutaREAL[®] Norovirus (NV) *real time* RT-PCR Kit



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

Qualitativer Test zum spezifischen Nachweis von **Noroviren** (Genogruppe I und II) im *real time* PCR-Kapillarsystem (z. B. Light Cycler[®], **Roche***).

REF KG2934132 

REF KG2934196 



* MutaREAL[®] 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 **MutaREAL® Norovirus** *real time* RT-PCR - Kit ist ein qualitativer Test (Quantifizierung *optional*) zum spezifischen Nachweis von Noroviren (Genogruppe I und II) in Stuhlproben mittels *real time* PCR - Kapillarsystem (z. B. LightCycler®, **Roche**). Der Test wird unter der **Lizenz** von **Roche Molecular Systems, Inc.** in Verkehr gebracht.

2. EINLEITUNG

Gastrointestinale Infektionen können lebensbedrohende Krankheiten hervorrufen, welche unter Umständen letztendlich sogar tödlich enden. Es konnte gezeigt werden, dass die genetisch heterogene Gruppe der **Noroviren** (formal als Norwalk-Viren bezeichnet) weltweit die Hauptursache der nicht-bakteriellen Gastroenteritis darstellt. Noroviren gehören zur Familie der **Caliciviridae** und sind unterteilt in die Genogruppe I (mit 7 Subtypen) bzw. II (mit 13 Subtypen). Das Center of Disease Control (CDC, Atlanta, USA) geht davon aus, dass 23 Millionen Gastroenteritis- Fälle/ Jahr von humanen Calciviriden hervorgerufen werden. Dabei sind ca. 66% aller auf Nahrungsmittel- bzw. Wasserquellen beruhenden Infektionskrankheiten mit Norovirus assoziiert und nur ca. 30,2% bakteriellen bzw. 2,6% parasitären Ursprungs (Mead et al., 1999).

Die Reagenzien des **MutaREAL® Norovirus** - Kits erkennen Stämme mit großer genetischer Diversität:

GGI: Norwalk, Southampton, Queens Arms, Desert Shield, Winchester, Sindleshm, Ciba

GII: Lordsdale, Melksham, Hawaii, Mexico, Leeds, Hillingdon, Snow Mountain, Toronto

Noroviren sind kleine, nicht umhüllte Viren mit einem (einzelnsträngigen) **ssRNA**-Genom. Sie sind **resistent** gegenüber hohen Temperaturen (60°C), Säuren (pH 3) und Chlorit (10 mg/L). Die Noroviren werden **indirekt** über kontaminierte Lebensmittel und Wasser übertragen, aber auf Grund Ihres enorm hohen Ansteckungspotentials auch sehr häufig **direkt** von Person zu Person.

3. TESTPRINZIP

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

Der erste Schritt des Norovirusnachweis ist eine **reverse Transkription (RT)**, in welcher das virale ssRNA-Genom in cDNA umgeschrieben wird. Anschließend werden mit einer thermostabilen DNA-Polymerase mittels Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) für **Norovirus I** bzw. **II** spezifische Genfragmente amplifiziert.

Die **Zielsequenz** für die Detektion befindet sich in der Region innerhalb der **ORF1/ ORF 2 – junction!**

Nachfolgend wird die Spezifität des entstandenen Amplikons durch *real time* Hybridisierung und anschließende Hydrolyse von **Norovirus I** bzw. **II** spezifischen Sonden (mit Fluorophor- und Quencher-molekül markierte Oligonukleotide) überprüft. Das dabei emittierte Fluoreszenzsignal wird von der optischen Einheit des verwendeten *real time* PCR-Kapillarsystems (z. B. Light Cycloer®, **Roche**) gemessen. Die Detektion **spezifischer Norovirus-Amplifikate** in den *real time* PCR-Reaktionsgefäßen wird bei **530 nm** durchgeführt (z. B. bei LightCycler® 1.5 und 2.0 jeweils Fluorimeter-Kanal **F1**).

Zudem überprüft eine in jede Reaktion eingeschlossene **interne Kontrolle (IC)**, welche parallel zu den Proben co-amplifiziert und detektiert wird, eine mögliche Inhibition von **reverser Transkription (RT)** bzw. **PCR** (bei dieser IC handelt es sich um RNA des Bakteriophagen MS-2). Da produktionsbedingt Schwankungen in der Emission des Fluoreszenzfarbstoffs der IC auftreten können, wird die Detektion der IC bei **640 nm** und **zugleich** bei **705 nm** durchgeführt, also sowohl im **F2-**, als auch **F3-Kanal** (beim LightCycler® 1.5) bzw. im **F4-** und **F6-** Kanal (beim LightCycler® 2.0).

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	1x	470 µl	2x	700 µl	gelb
A3	Positivkontrolle (1x 10 ⁵ Kopien/ µl)	1x	50 µl	2x	50 µl	rot
A4	Negativkontrolle	1x	50 µl	2x	50 µl	grün

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Benötigte Materialien - mitgeliefert:

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

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

- *real time* PCR-Kapillarsystem (z. B. LightCycler® Instrument, Roche)
- PCR-Reaktionsgefäße (z. B. LightCycler® Kapillaren, Roche)
- Tischzentrifuge (z. B. LightCycler® Kapillar-Zentrifuge, Roche)
- Kryobehälter für PCR-Reaktionsgefäße (z.B. LightCycler® Cooling Block, Roche)
- Color Compensation Kit (z. B. LightCycler® - Roche)
- RNA-Extraktionskit für Stuhlproben (**MutaCLEAN® Stool (vRNA)**, KG1035, Immundiagnostik)
- Pipetten (0,5 – 200 µl)
- sterile Filterspitzen für Mikropipetten
- sterile Reaktionsgefäße

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Alle Reagenzien (A1 bis A4) **bis zum unmittelbaren Gebrauch bei <-20°C lagern**.
- Reagenzien **A2** und **A3 unbedingt** nicht mehr als **3x auftauen** (bei Bedarf nach 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.
- **MutaREAL® 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 mit nachfolgender Amplifikation und kombinierter Detektion der entstandenen cDNA-Templates mittels Hybridisierungssonden.
- C) Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Software des *real time* PCR-Kapillarsystems.

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. Die Wasserkontrolle muss analog einer Stuhlprobe behandelt werden.
- 3) Falls die *real time* PCR nicht sofort durchgeführt wird, die Proben bei **< -20°C** aufbewahren.

B) REAL TIME Norovirus 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 PCR - Master-Mix mit einer Mikropipette und sterilen Filterspitzen in jedes PCR-Reaktionsgefäß (z.B. LightCycler® Kapillare) vorlegen.

5 µl der Proben-RNA bzw. der Positiv- und Negativ- Kontrollen (A3 und A4) zu den jeweils korrespondierenden PCR-Reaktionsgefäßen zugeben (es empfiehlt sich, die Kapillaren der Proben jeweils unverzüglich nach Befüllung zu verschließen und die Negativ-Kontrolle als reine Kontaminationskontrolle zwar zuerst zu pipettieren, aber erst als letzte zu verschließen).

- 4) Die Reagenzien in den PCR-Reaktionsgefäßen durch kurzes Zentrifugieren am Gefäßboden sammeln (für Kapillaren LightCycler® Kapillar-Zentrifuge verwenden).
- 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		NONE
60°C	für	30 sec	ramping time: 20°C/ sec – acquisition mode here:	SINGLE
72°C	für	20 sec		NONE
40°C	für	10 sec	Abkühlung	

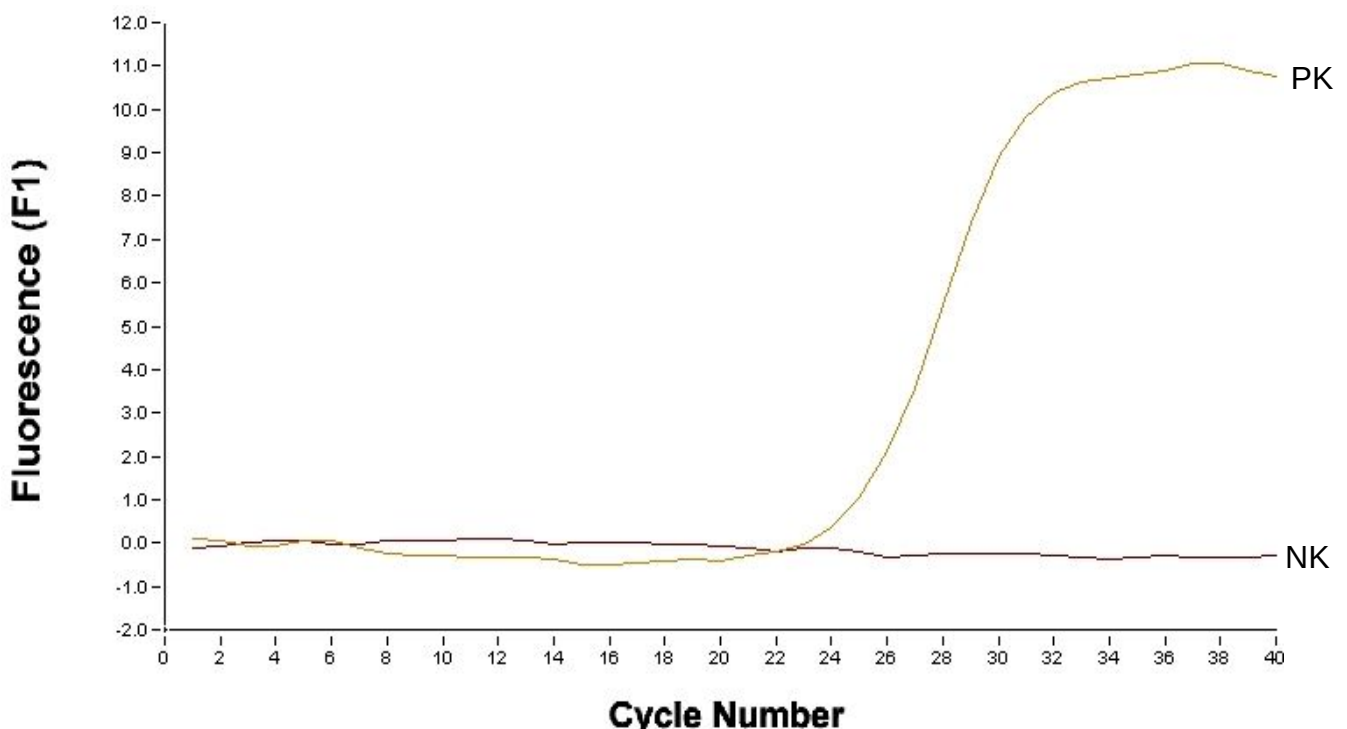
C) RT-PCR ANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- 1) Durchführung der *real time* RT-PCR (z. B. LightCycler®- Kapillarsystem 1.5 bzw. 2.0, Roche):
- 2) Schalten Sie den **Color Compensation File ein** (durch Aktivierung des Felds *Choose CC- File*). Dieser wird für die gleichzeitige Nutzung verschiedener Farbstoffmarkierter Sonden benötigt. Der CC-File (zur Fluoreszenzüberstrahlungskorrektur) ist laut Empfehlung des Geräteherstellers Roche **halbjährlich zu aktualisieren**: ansonsten können durch suboptimale Fluoreszenzsignal-Detektion geringere ct-Werte resultieren!

- 3) Das Ergebnis der Norovirus-spezifischen Amplifikation wird im **530 nm**- Kanal (**F1**) angezeigt; das der internen Kontrolle im **640 nm** - bzw. **705 nm** - Kanal (**F2 + F3** beim LC1.5 bzw. **F4 + F6** beim LC2.0).

Folgende Resultate sind möglich:

- Bei **530 nm** (F1) wird ein Signal detektiert:
Das Ergebnis ist positiv: **die Probe enthält Norovirus - RNA**.
In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im 640 nm- bzw. 705 nm- Kanal nicht notwendig, da hohe *Norovirus* cDNA - Konzentrationen zu einem verminderten bzw. ganz fehlenden Fluoreszenz-Signal der IC führen kann (Kompetition).
- Bei 530 nm (F1) wird kein Signal detektiert, jedoch im **640 nm** - bzw. **705 nm** – Kanal (Signal der IC): Das Ergebnis ist negativ: **die Probe enthält keine Norovirus - RNA**.
Das detektierte Signal der IC schließt die Möglichkeit einer PCR-Inhibition aus.
- Weder bei 530 nm (F1), noch bei 705 nm wird ein Signal detektiert.
Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden.
Die *real time* RT-PCR - Reaktion wurde **inhibiert**.

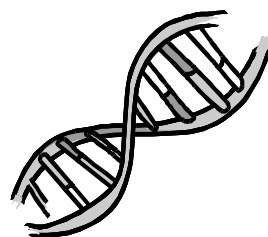


Anmerkung:

- Die Konzentration der **PK ist 1×10^5 Kopien/ μ l** (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/ μ l**).

MutaREAL® 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 *real time* PCR capillary systems (e. g. LightCycler® 1.5/ 2.0, **Roche***).

REF KG2934132 

REF KG2934196 



*** MutaREAL® 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 **MutaREAL® Norovirus** *real time* RT-PCR kit is a qualitative assay for the specific detection of Norovirus (GG I and II) in stool samples using *real time* RT-PCR capillary systems (e.g. Light Cycler® 1.5/ 2.0, Roche). 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 transmission 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 **MutaREAL® 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

MutaREAL® 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 **MutaREAL® 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 (LightCycler 1.5 respectively 2.0- software). **Norovirus-specific amplification** is measured in the **F1**-channel (**530 nm**).

Furthermore, **MutaREAL® Norovirus** *real time* RT-PCR - kit contains also an additional RNA internal control. This is detected in an independent (heterologous) amplification step. This internal control (IC) identifies potential inhibition of reverse transcription/ amplification during PCR. The **internal control** is measured at **710 nm** in channel **F3** (LightCycler 1.5) respectively **F6** (LightCycler 2.0).

4. KIT CONTENT

Each kit contains enough reagents to perform **32** or **96** tests (the vials contain the indicated amounts and a further surplus) and also a package insert. Please check provided manual always for current date and use it together with the reagents in the kit.

	Reagent	Amount (32x)		Amount (96x)		Colour
A1	Enzyme Mix	1x	18 µl	1x	50 µl	blue
A2	Primer-/ Probe Mix/ IC	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

5. TEST PERFORMANCE

Required materials - provided:

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

Required materials - not provided:

- *real time* PCR capillary system (e. g. LightCycler® instrument, Roche)
- *real time* PCR reaction tubes (e. g. LightCycler® capillaries, Roche)
- Table centrifuge (e. g. LightCycler® capillary centrifuge, Roche)
- Cryocontainer for PCR reaction tubes (e. g. LightCycler® cooling block, Roche)
- Color Compensation Kit for the used *real time* PCR system
- RNA extraction kit for stool samples (e. g. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1035, Immundiagnostik)
- Pipets (0.5 µl – 200 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 the reagents A2 – A4 (in case of sporadic use prepare **suited aliquots**).
- **Cool all reagents** during the working steps.
- Primer-/ Probe-Mix (A2) should be stored dark (**light protection of** fluorescence probes).
- All reagents can be used until the expiration date printed on the labels.

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- **MutaREAL® Norovirus** is **Roche-licensed**, no further 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 and avoid aerosols.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- 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)**, KG1035 from **Immundiagnostik**).
- B) reverse transcription of RNA and subsequent amplification/ combined detection of generated cDNA templates using hybridisation probes.
- C) Result interpretation with the software of *real time* PCR instrument (LightCycler 1.5/ 2.0).

A) RNA EXTRACTION

- 1) RNA Extraction of viral RNA is done by use of a commercial available RNA isolation kit (e.g. **MutaCLEAN® Stool (Viral RNA)**, KG1035 from **Immundiagnostik**) from stool samples according to the instructions of the manufacturer. As starting material use an appropriate aliquot of supernatant gained from a stool sample diluted with 1 ml of pure water (do not use any buffer) after the set-down of solid particles.
- 2) 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 (MutaREAL®) RT-PCR-PROTOCOL

Please **read** careful the manufacturer's instructions **before** starting the 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!

- 2) 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 the *real time* PCR reaction tubes (e. g. LightCycler® capillaries); do not forget the controls.

Add **5 µl** of sample RNA (or positive/ negative/ water control) to each corresponding PCR reaction tube (LightCycler capillary). It is recommended to close the capillaries immediately after filling and to prepare the negative control indeed first but to close at last (as contamination control).

Spin briefly to collect all reagents at the bottom of capillaries (use LC capillary centrifuge).

- 4) Transfer the capillaries into the *real time* PCR system (LightCycler rotor) 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**

72°C for **20 sec**

40°C for **10 sec**

ramping time: **20°C/sec** – acquisition mode here:

NONE

SINGLE

NONE

C) PCR ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

- 1) Perform *real time* RT-PCR (in LightCycler® capillary system, Roche) with **MutaREAL® Norovirus**.
- 2) Switch **on** the **color compensation** filter required because of the simultaneous use of several fluorescence-marked probes (by activating the field “Choose CCC File”).
- 3) The result of **specific Norovirus amplification** is shown in the **F1-channel** (at **530 nm**) and the result of the extraction efficiency control (= internal control **IC**) is shown at **705 nm** (channel F3 respectively F6).

Following results can arise:

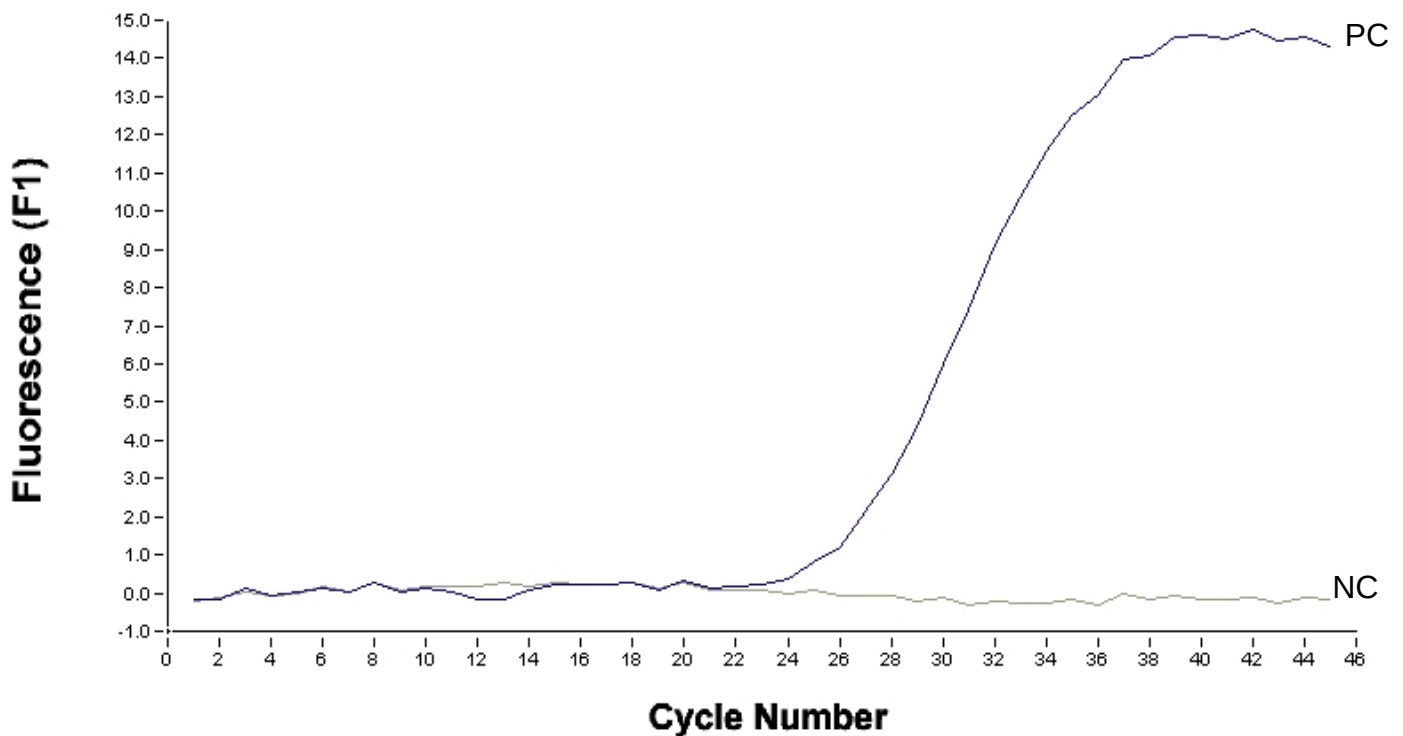
- A signal is detected at 530 nm (F1).
The result is positive: **The sample contains Norovirus RNA.**

In this case, the detection of a signal at 705 nm is inessential, as high concentrations of *Norovirus* cDNA can lead to a reduced or absent fluorescence signal of the internal control in channel F3 (competition).

- No signal is detected at 530 nm (F1), but only at 705 nm (F3, signal of the internal control).
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.

- Neither at 530 nm (F1) nor at 705 (F3) nm is a signal detected.
A diagnostic statement can not be made.
An **inhibition** of the *real time* RT-PCR 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.