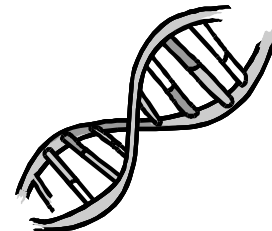


MutaREX[®] Norovirus *real time* RT-PCR Kit



Qualitativer Test für den spezifischen Nachweis von **Noroviren** (GG I, II) im *real time* PCR-Kapillarsystem (z. B. LightCycler[®] 1.5/ 2.0, **Roche***) und gleichzeitiger Überprüfung der RNA-Extraktionseffizienz aus Stuhl-proben.



KG290132



KG290196



* MutaREX[®] 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

Der **MutaREX® Norovirus** *real time* RT-PCR - Kit ist ein qualitativer Test zum spezifischen Nachweis von Noroviren (Genogruppe I und II) in Stuhlproben mittels *real time* PCR - Kapillarsystem (z. B. LightCycler® 1.5/ 2.0, Roche). Gleichzeitig ist eine Überprüfung der RNA-Extraktionseffizienz über eine separate interne PCR-Kontrolle möglich.

Das Testkit 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 hochinfektösen 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 pH3 sowie Chloritkonzentrationen bis 10 µg/ml. NV-Infektionen können das ganze Jahr über auftreten, jedoch kommt es in Mitteleuropa zwischen Oktober - 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.

MutaREX® 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, Sindlesham, Chiba

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

3. TESTPRINZIP

Das **MutaREX® Norovirus** *real time* RT-PCR Kit enthält spezifische Primer, Fluoreszenz-farbstoff-markierte Sonden und weitere Reagenzien für die spezifische 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 **MutaREX® Norovirus** verwendet werden.

Die **reverse Transkription (RT)** der möglicherweise 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 (GGI bzw. GGII)** ist die Region innerhalb der **ORF1/ ORF 2- junction**.

Die Detektion der NV-Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch eine Hybridisierung und anschließende Hydrolyse mit Norovirus-spezifischen Fluoreszenz-Sonden, deren emittiertes Signal von der optischen Einheit des LightCycler (1.5 bzw. 2.0) Instruments detektiert wird.

Diese **Norovirus-spezifische Amplifikation** erfolgt im **Fluorimeterkanal F1** (bei **530 nm**).

Zusätzlich verfügt das **MutaREX[®] Norovirus** *real time* RT-PCR - Kit über eine separate RNA-Extraktionskontrolle, die vor der eigentlichen Nukleinsäureisolierung zugefügt wird und dann in einem zweiten heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen ist.

Diese interne Kontrollreaktion (IC) ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der RNA-Extraktion, zum anderen kann eine mögliche Inhibition der Reversen Transkription bzw. PCR identifiziert werden. Das Risiko Falsch-Negativer Ergebnisse wird dadurch deutlich minimiert.

Die Detektion der amplifizierten separaten **RNA-Extraktionskontrolle** (= interne PCR-Kontrolle) erfolgt bei **705 nm** im **Fluorimeterkanal F3** (LightCycler[®] 1.5) bzw. **F6** (LightCycler[®] 2.0).

4. KITBESTANDTEILE

Jeder Testkit enthält Reagenzien zur Durchführung von **32** bzw. **96** Bestimmungen, sowie eine Gebrauchsanleitung.

Bezeichnung	Reagenz	Konfektion 32		Konfektion 96		Deckelfarbe
A1	Enzym Mix	1x	30 µl	1x	90 µl	blau
A2	Primer-/ Sonden Mix	1 x	500 µl	2 x	750 µl	gelb
A3	Positivkontrolle	1 x	20 µl	2 x	30 µl	rot
A4	Negativkontrolle	1 x	100 µl	1 x	200 µl	grün
A5	Extraktionskontrolle (IC)	2 x	90 µl	3 x	200 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-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 (z. B. von Immundiagnostik: **MutaCLEAN[®] Stool (Viral RNA)**, KG1034)
- Pipetten (0,5 – 1000 µl) mit sterilen Filterspitzen für
- sterile Reaktionsgefäße

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Alle Reagenzien (A1 bis A5) **bis zum unmittelbaren Gebrauch bei <-20°C** lagern.
- Ein **mehrfaches Auftauen/ Einfrieren** der Reagenzien A2, A3 und A5 ist **unbedingt** zu **vermeiden** (bei Bedarf nach dem erstmaligem Auftauen **geeignete Aliquots** abfüllen und gleich wieder einfrieren).
- Während der PCR-Vorbereitung alle Arbeitsschritte möglichst zügig in einem Kryobehälter (z.B. Light Cycler® Cooling Block) durchführen bzw. alle Reagenzien stets **geeignet kühlen**.
- Primer-/ Sonden-Mix (A2) zum Schutz der Fluoreszenzsonden vor **Lichtkontakt schützen**.
- Alle Reagenzien können bis zum Ablauf des (auf der Kitpackung angegebenen) Mindesthaltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- **MutaREX® Norovirus** ist **Roche-lizenziert**, d. h. es sind **keine** weiteren Gebühren für „reported-results“ mehr erforderlich.
- Dieser Test sollte durch speziell in molekularbiologischen Techniken geschultes Personal durchgeführt werden.
- Wie alle klinischen Proben sollten diese als potentiell infektiöses Material angesehen und entsprechend auch entsorgt werden.
- 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 die Proben-RNA in die PCR-Gefäße pipettiert werden.

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

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Die gesamte Durchführung ist in folgende drei Schritte aufgeteilt:

- A) RNA-Extraktion aus Stuhlproben (z.B. mit MutaCLEAN® Stool (Viral RNA), KG1034 von Immundiagnostik).
- B) Reverse Transkription der RNA und nachfolgende Amplifikation/ kombinierte Detektion der entstandenen cDNA-Templates mittels der Hydrolysesonden.
- C) Interpretation der Ergebnisse mit der Software des verwendeten *real time* PCR-Systems.

A) RNA-EXTRAKTION

- 1) Die Extraktion viraler RNA wird mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungs-Kits (z.B. MutaCLEAN® Stool (Viral RNA), KG1034 von Immundiagnostik) aus Stuhlproben durchgeführt.
Dazu eine ca. erbsengroße Stuhlprobe in 1,5 ml Reinstwasser (keine Puffer verwenden) aufschwemmen (gut vortexen!) und nach Absinken der festen Bestandteile (gegebenenfalls 5 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 (gegebenenfalls 5 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 **MutaRex® 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 Puffer-volumen (bei MutaCLEAN Stool (Viral RNA): 200 µl) mit der Anzahl (n) der insgesamt durchzuführenden Extraktionen multipliziert wird (dabei die Wasserkontrolle nicht vergessen und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit einen zusätzlicher „virtuellen“ Ansatz mit einrechnen!) 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 dem PCR-Master Mix zugesetzt werden – in dem Fall werden lediglich 0,5µl / Probe eingesetzt!
- 4) Falls die *real time* PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die RNA-Extrakte gemäß der Angabe des RNA-Aufreinigungs-Kit Herstellers (i. d. R. bei **<-20°C**) aufbewahrt werden.

B) REAL TIME Norovirus RT-PCR PROTOKOLL

Bitte unbedingt das gesamte Protokoll lesen, bevor mit der Durchführung begonnen wird. Der Ansatz einer Gesamtmenge an notwendigem Master-Mix für die jeweilige Anzahl an Proben und entsprechenden Kontrollen wird folgendermaßen ermittelt:

- 1) Die Enzym-Mix Menge für eine Reaktion mit der Anzahl (n) der durchzuführenden Reaktionen (inklusive Kontrollen A3 und A4) multiplizieren und zum Ausgleich der Pipettierungenauigkeit einen zusätzlichen (virtuellen) Ansatz berechnen. Mit allen weiteren Reagenzien in der gleichen Weise verfahren.

Alle Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen!

- 2) Zur Herstellung des PCR Master Mix folgende Mengen der Reagenzien A1 (Enzym-Mix) und A2 (Primer-/Sonden-Mix) in einem sterilen Reaktionsgefäß durch **mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (ca. 15 – 20 x !)** gut mischen (**NICHT VORTEXEN !**):

Reaktionsvolumen	Master-Mix Volumen
0,8 µl Enzym-Mix (A1)	0,8 µl x (n +1)
14,2 µl Primer-/ Sonden-Mix (A2)	14,2 µl x (n +1)

- 3) **15 µl** dieses Master-Mix in jedes der benötigten PCR-Gefäße (LightCycler® Kapillare) 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) 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**

60°C für **30 sec**

72°C für **20 sec**

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

NONE

SINGLE

NONE

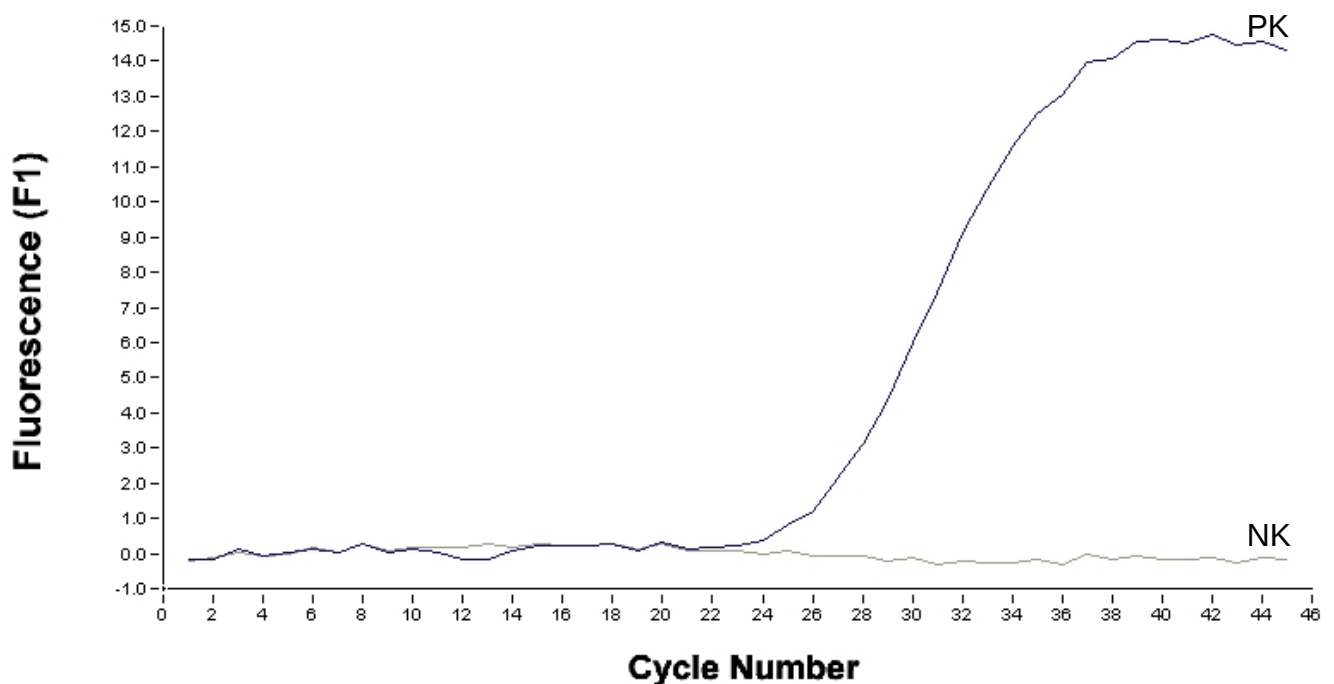
40°C für **10 sec** Abkühlung

C) RT-PCR ANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- 1) Durchführung der *real time* RT-PCR (z.B. LightCycler® - Kapillarsystem, **Roche**):
- 2) Schalten Sie den **Color Compensation-** Filter **ein**, welcher für die gleichzeitige Nutzung der verschiedenen Farbstoff-markierten Sonden benötigt wird (durch Aktivierung des Felds „Choose CCC File“).
- 3) Die Auswertung erfolgt bis PCR-Zyklus **ct40**: das Ergebnis der Norovirus-spezifischen Amplifikation wird im 530 nm - Kanal (F1) angezeigt; das der internen Kontrolle (separate Extraktionskontrolle) im 705 nm - Kanal (F3 bzw. F6).

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 705 nm- Kanal nicht notwendig, da hohe *Norovirus* cDNA- Konzentrationen zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenz-Signal der internen Kontrolle im Kanal F3 bzw. F6 führen kann (Kompetition).
- Bei 530 nm (F1) wird kein Signal detektiert, jedoch im 705 nm- Kanal F3 (Signal der internen Kontrolle/ separate Extraktionskontrolle).
Das Ergebnis ist negativ: die Probe enthält **keine** *Norovirus* - RNA.
Das detektierte Signal der internen Kontrolle schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften RNA-Isolation sowie einer Inhibition der reversen Transkription und PCR aus.
* Die Negativkontrolle enthält keine IC.
- Weder bei 530 nm (F1) noch bei 705 nm (F3) wird ein Signal detektiert.
Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden.
Die *real time* RT-PCR - Reaktion wurde **inhibiert** bzw. es trat ein **Fehler bei der RNA-Extraktion** auf.
* Die Negativkontrolle enthält keine IC, d.h. sie ist die einzige „Probe“, bei der beide Kanäle negativ sind.

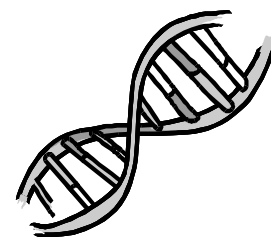


Anmerkung:

- * Die PK besitzt eine Konzentration von ca. 100000 Kopien/ μ l (also 500000 Kopien in der PCR) und generiert Amplifikationssignale beim ct-Wert 25 (+/- 1). Jede 1:10-Verdünnung resultiert in einer (logarithmischen) ct-Wert-Erhöhung um 3,3 Einheiten.
- * Die Sensitivität der PCR beträgt ca. 1 - 5 Kopien/ μ l.

MutaREX[®] Norovirus

real time RT-PCR Kit



Qualitative assay for specific detection of **Norovirus** (GG I, II) using *real time* PCR capillary systems (e. g. LightCycler[®] 1.5/ 2.0, **Roche***) and parallel control of RNA extraction efficiency from stool samples.

REF KG290132 

REF KG290196 



* MutaREX[®] 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 **MutaREX[®] 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. LightCycler[®] 1.5/ 2.0, 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 **MutaREX[®] 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

MutaREX[®] 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 **MutaLREX[®] 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, **MutaREX[®] 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 (heterologous) 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 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 and also a package insert.

	Reagent	Confection 32		Confection 96		Colour
A1	Enzyme Mix	1x	30 µl	1x	90 µl	blue
A2	Primer-/ Probe Mix	1 x	500 µl	2 x	750 µl	yellow
A3	Positive Control	1 x	20 µl	2 x	30 µl	red
A4	Negative Control	1 x	100 µl	1 x	200 µl	green
A5	Extraction Control (IC)	2 x	90 µl	3 x	200 µl	transparent

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 – 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 the reagents A2, A3 and A5 (if 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.
- **MutaREX® 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) 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 1,5 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). Multiplicate the buffer volume necessary for one extraction (this is 200 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:
= [extraction buffer volume + 5µl A5] x [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 (MutaREX®) RT-PCR-PROTOCOL

Please **read** carefully 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
0.8 µl Enzyme Mix (A1)	0.8 µl x (n+1)
14.2 µl Primer-/ Probe Mix (A2)	14.2 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

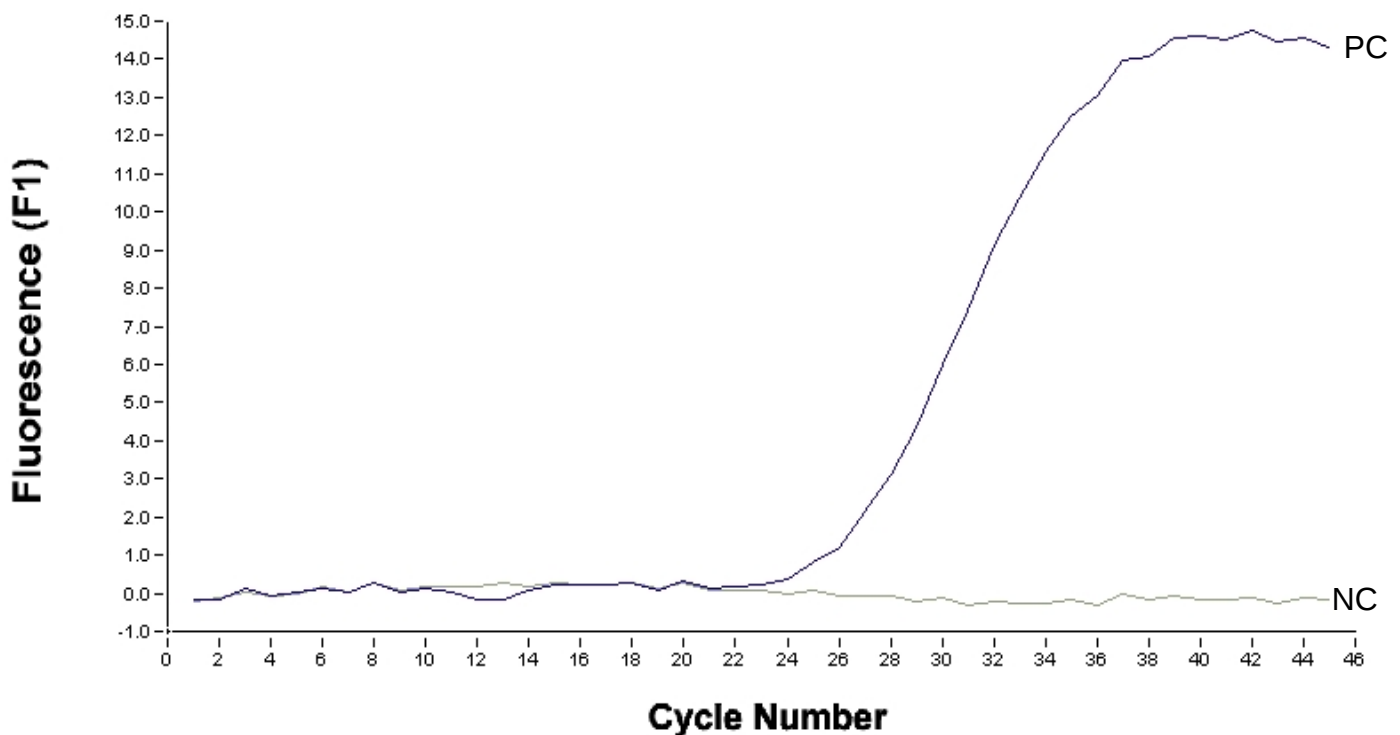
C) PCR ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

- 1) Perform *real time* RT-PCR (in LightCycler® capillary system, Roche) with **MutaREX® 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.