

MutaPLEX® Norovirus

real time RT-PCR kit

*Test für den in-vitro-Nachweis von Norovirus-RNA
(Genogruppe I und Genogruppe II) in Stuhlproben*

*Test for the in vitro detection of norovirus RNA
(genogroup I and genogroup II) in stool samples*

Gültig ab / Valid from 2016-12-01



KG190132
KG190196



32/96



-18°C



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	1
2	EINLEITUNG	1
3	TESTPRINZIP	1
4	INHALT DER TESTPACKUNG	2
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	3
7	WICHTIGE HINWEISE	3
8	ALLGEMEINE HINWEISE	3
9	PROBENMATERIAL	4
10	PROBENVORBEREITUNG	4
11	KONTROLL-RNA (K5)	4
	<i>RNA-Isolation aus Stuhl, Nahrungsmitteln und Umweltproben</i>	<i>4</i>
12	REAL-TIME-RT-PCR	5
	12.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	12.2 <i>Durchführung</i>	5
13	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	8
14	VALIDIERUNGSDATEN	9
15	EINSCHRÄNKUNGEN	10
16	PROBLEMBEHANDLUNG	10
17	LEISTUNGSDATEN	12
	17.1 <i>Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	12
	17.2 <i>Analytische Sensitivität</i>	13
18	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	14
19.	LITERATUR	15

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kit dient dem QCMD-konformen Nachweis von Norovirus-RNA (Genogruppe I und II) in Stuhlproben (bzw. Umwelt-/Lebensmittelproben) mittels Real-time-RT-PCR in offenen Real-time-PCR-Systemen.

2 EINLEITUNG

Die umgangssprachlich als Magen-Darm-Grippe bezeichnete virale Gastroenteritis wird in der Mehrzahl durch die Spezies der humanpathogenen Noroviren verursacht. Bei diesen hochinfektiösen Viren, die zur Familie der Caliciviridae gehören, handelt es sich um unbehüllte RNA-Viren. Sie sind sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen und überstehen beispielsweise Temperaturen zwischen -20°C und +60°C oder saure Umgebungen bis pH 3.

Die humanpathogenen Noroviren weisen eine hohe genetische Variabilität auf und werden daher nochmals in unterschiedliche Genogruppen unterteilt. Die Übertragung der Viren erfolgt von Mensch zu Mensch über Kontakt- und Schmierinfektion. Bereits eine sehr geringe Anzahl von Viruspartikeln reicht aus, um eine Infektion auszulösen. In Krankenhäusern, Seniorenheimen, Kindergärten und sonstigen Gemeinschaftseinrichtungen kommt es daher gelegentlich zu Endemien. Norovirusinfektionen können das ganze Jahr über auftreten, jedoch kommt es in Mitteleuropa zwischen Oktober und März zu einem saisonalen Anstieg der Fälle.

Der MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kit weist Norovirusstämme mit großer genetischer Diversität nach, z.B. folgende Vertreter der humanen Genogruppen I bzw. II:

- GI: Norwalk, Desert Shield, Winchester, Queensarms, Southhampton, Chiba
- GII: Lordsdale, Bristol, Melksham, Toronto, Hawaii.

Aber auch Genogruppe-IV-Proben wurden bei den jährlichen QCMD (Quality Control Molecular Diagnostics)-Ringversuchen mit erfasst. Aktuelle QCMD-Zertifikate können bei Immundiagnostik angefordert werden.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden für den Nachweis von Norovirus (GI und GII) in Stuhl-, Lebensmittel- und Umweltproben nach vorausgegangener RNA-Extraktion.

Die Reverse Transkription (RT) der möglicherweise enthaltenen viralen RNA zu cDNA und die anschließende Amplifikation von noroviruspezifischen Fragmenten mittels PCR erfolgen in einem Schritt. Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit

durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der noroviruspezifischen Fluoreszenzsonden. Die Detektion erfolgt im FAM-Kanal.

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kit über eine Kontroll-RNA (K5), die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum einen das Aufdecken von Fehlern bei der RNA-Extraktion, zum anderen kann eine mögliche Inhibition der Reversen Transkription oder der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch-negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der RNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET- Kanal.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG190196) bzw. 32 (KG190132) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kits

	Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
			32	96
K1	Reaction Mix	gelb	1 x 506 µl	2 x 759 µl
K2	Enzyme	blau	1 x 6,4 µl	1 x 19,2 µl
K3	Positive control	rot	1 x 50 µl	1 x 100 µl
K4	Negative control	grün	1 x 50 µl	1 x 100 µl
K5	Control RNA	transparent	1 x 160 µl	2 x 240 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- RNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- Reinstwasser*
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel
- optional: Pipettiergeräte zur Automation
- optional: VLP-RNA (virusähnliche Partikel, Details siehe Kapitel 11)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und

organischen Molekülen ist (frei von Partikeln $> 0,2 \mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S/cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2 \text{M}\Omega \text{cm}$).

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -18°C zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate verwendbar. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist virale RNA, die aus klinischen Proben (Stuhl-, Nahrungsmittel-, Umweltproben) isoliert wurde.

10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR ist geeignet für den Nachweis von Norovirus-RNA, die zuvor aus klinischen Proben mit Hilfe geeigneter Methoden isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur RNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038).

Stuhlproben

Stuhlproben (erbsengroße Menge) in ca. 1,5 ml Reinstwasser aufschwemmen, gut vortexen und nach Absinken der festen Bestandteile (gegebenenfalls 5 min bei 3500 g in einer Tischzentrifuge zentrifugieren) den Überstand als Ausgangsmaterial verwenden.

Sehr flüssige Stuhlproben können direkt, also ohne vorherige Aufschwemmung, in der Extraktion eingesetzt werden. Diese Proben ebenfalls zuerst gut vortexen und nach Absinken der festen Bestandteile (gegebenenfalls 5 min bei 3500 g in einer Tischzentrifuge zentrifugieren) den Überstand unverdünnt verwenden.

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Stuhlprobe behandelt werden.

Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-RNA).

Falls die Real-time-RT-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die RNA-Extrakte entsprechend den Angaben des RNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

11 KONTROLL-RNA (K5)

Der MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR enthält eine Kontroll-RNA (K5), die zum einen als RNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Reversen Transkription bzw. der PCR aufzeigt.

Die virusähnlichen Partikel (*virus-like particles*, VLP) sind nicht im Kit enthalten.

RNA-Isolation aus Stuhl, Nahrungsmitteln und Umweltproben

a) Kontroll-RNA (K5) oder VLP-RNA als Extraktionskontrolle

MutaPLEX® Norovirus Kontroll-RNA (K5) oder VLP-RNA zur RNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-RNA (K5) oder VLP-RNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die RNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-time-RT-PCR nach Protokoll A an.

Die Kontroll-RNA (K5) muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.

b) Kontroll-RNA (K5) als interne Kontrolle der Real-time-RT-PCR

Sollte keine Kontrolle der RNA-Extraktion gewünscht sein, wohl aber eine Kontrolle der RT-PCR, so kann die Kontroll-RNA (K5) erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden. In diesem Fall ist die Real-time-RT-PCR nach Protokoll B anzusetzen.

12 REAL-TIME-RT-PCR

12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle (K3) und eine Negativkontrolle (K4) enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien – bis auf das Enzym (K2) – müssen komplett aufgetaut, gemischt (Reaktions-Mix (K1) nicht vortexen, sondern durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren mischen) und kurz anzentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

12.2 Durchführung

Falls die Kontroll-RNA (K5) oder VLP-RNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-RNA (K5) lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-time-RT-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

Protokoll A

Die Kontroll-RNA (K5) oder VLP-RNA wurde bereits zur RNA-Extraktion zugegeben (siehe Kapitel 11 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix (Kontroll-RNA (K5) wurde während der RNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
15,8 µl Reaction Mix (K1)	15,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme (K2)	0,2 µl x (N+1)

Protokoll B

Die Kontroll-RNA (K5) wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-time-RT-PCR verwendet (siehe Kapitel 11 „Kontroll-RNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mix (die Kontroll-RNA (K5) wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
15,8 µl Reaction Mix (K1)	15,8 µl x (N+1)
0,2 µl Enzyme (K2)	0,2 µl x (N+1)
0,2 µl Control RNA (K5)*	0,2 µl x (N+1)*

* Die durch Zugabe der Kontroll-RNA (K5) verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

Protokoll A und B: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 16 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- 4 µl der RNA-Eluat (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle (K3) und die Negativkontrolle (K4) in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-time-RT-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Für die Real-time-RT-PCR ist das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 5: Real-time-RT-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
cDNA-Amplifikation			45 Messung am Ende dieses Schrittes
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing	40 s	60 °C	

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen	
LightCycler 480I	Norovirus Kontroll-RNA	483–533 523–568	Farbkompensationskit benötigt, z. B. Universal CC FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	Norovirus Kontroll-RNA	465–510 533–580		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	Norovirus Kontroll-RNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference Dye: None
ABI 7500	Norovirus Kontroll-RNA	FAM JOE	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	Norovirus Kontroll-RNA	Grün Gelb	Gain 5 Gain 5	

13 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die noroviruspezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die Amplifikation der Kontroll-RNA (K5) wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

- **Im FAM-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Das Ergebnis ist positiv, die Probe enthält Norovirus-RNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal nicht notwendig, da eine hohe Norovirus-cDNA-Konzentration zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenzsignal der Kontroll-RNA führen kann (Kompetition).

- **Im FAM-Kanal wird kein Signal detektiert, jedoch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal:**

Das Ergebnis ist negativ, die Probe enthält keine Norovirus-RNA.

Das detektierte Signal der Kontroll-RNA (K5) schließt die Möglichkeit einer fehlerhaften RNA-Extraktion aus (falls die Kontroll-RNA (K5) als Extraktionskontrolle benutzt wurde). Außerdem sind weder die reverse Transkription noch die PCR komplett inhibiert. Unterscheidet sich der CT-Wert der internen Kontrolle der Wasserkontrolle stark von dem der Probe, so liegt eine teilweise Inhibition vor, die dazu führen kann, dass schwach positive Proben nicht erkannt werden (siehe Kapitel „Problembehandlung“).

- **Weder im FAM- noch im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal wird ein Signal detektiert:**

Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden.

Die Real-time-RT-PCR wurde inhibiert oder es trat ein Fehler bei der RNA-Extraktion auf. Wurde die Kontroll-RNA (K5) während der RNA-Extraktion zugefügt und nicht direkt in den PCR-Master-Mix gegeben, dann ist die negative Kontrolle (K4) in beiden Kanälen negativ.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-RT-PCR-Ergebnisse.

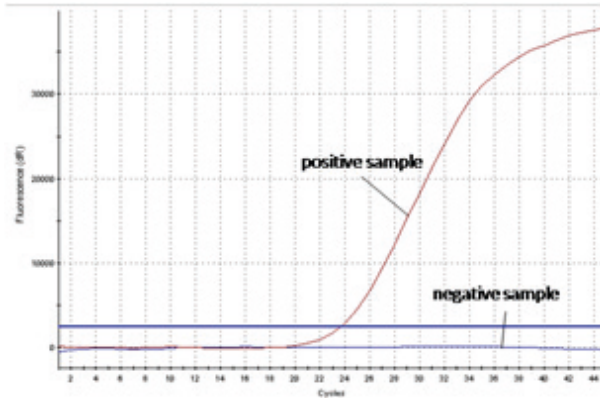


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im noroviruspezifischen FAM-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

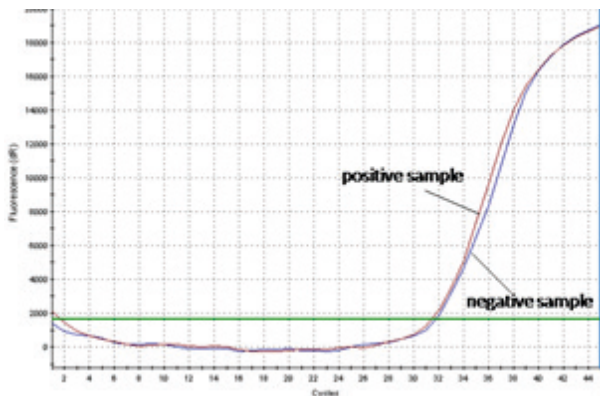


Abb. 2: Im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-RT-PCR vor, auch verlief die RNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

14 VALIDIERUNGSDATEN

Stellen Sie die Grenzwerte des Real-time-Geräts wie im Folgenden beschrieben ein.

Negativkontrollen

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Auftreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem CT, beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Er-

gebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

Positivkontrollen

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen CT-Wert von 30 fallen.

Interne Kontrollen

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der CT-Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der CT-Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein RNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der CT-Wert der internen Kontrolle unter 33 liegen.

15 EINSCHRÄNKUNGEN

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

Ein negatives Testergebnis schließt eine Norovirusinfektion nicht aus.

16 PROBLEMBEHANDLUNG

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-RT-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM-Kanal der Positivkontrolle (K3)

Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der noroviruspezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-RNA (K5).

Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-RT-PCR

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

Fehlerhaftes Real-time-RT-PCR-Temperaturprofil

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-RNA (K5) und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM-Kanal***Die Real-time-RT-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein***

Überprüfen Sie die Real-time-RT-PCR-Bedingungen (Kapitel 12).

Real-time-RT-PCR-Inhibition

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der RNA-Elution wird empfohlen).

Verlust der RNA während des Aufarbeitungsprozesses

Falls die Kontroll-RNA (K5) vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte RNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM-Kanal der Negativkontrolle (K4)***Kontamination des Real-time-RT-PCR-Ansatzes***

Wiederholen Sie die Real-time-RT-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle (K3) zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle (K4) in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen

Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-RT-PCR mit einem neuen Kit.

17 LEISTUNGSDATEN

17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Während der Validierungsstudie des MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kits wurden 45 positive und 50 negative Proben getestet. Der Wert für sowohl diagnostische Spezifität als auch Sensitivität wurde mit 100% bestimmt (Tabellen 7 und 8). Des Weiteren ergaben *in-silico*-Analysen der Primer und Sonden keine Kreuzreaktivität zu anderen gastroenterischen Pathogenen.

Sowohl der positive als auch der negative Vorhersagewert liegen bei 100%.

Tabelle 7: Übersicht über getestete Probenanzahl sowie sich daraus ergebende positive und negative Vorhersagewerte.

	Positive Proben	Negative Proben
MutaPLEX® Norovirus positiv	45	0
MutaPLEX® Norovirus negativ	0	50
Sensitivität	100%	
Spezifität	100%	

Tabelle 8: Diagnostische Spezifität

Virus/Bakterium	Anzahl getesteter Stämme	Ergebnis
Norovirus	6 + 39 clinical samples	positiv
Enterovirus	11	negativ
Adenovirus	1	negativ
Rotavirus	1	negativ
Astrovirus	1	negativ
Sapovirus	1	negativ
Listeria monocytogenes	1	negativ
Campylobacter	1	negativ
Citobacter	1	negativ
Salmonella	1	negativ
E. coli	1	negativ

17.2 Analytische Sensitivität











Die analytische Sensitivität des MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kits wurde anhand von QCMD-Ringversuchsproben ermittelt. Tabelle 9 zeigt die Testergebnisse. Selbst in den höchsten Verdünnungsstufen konnten alle positiven Proben bestimmt werden.

Tabelle 9: MutaPLEX® Norovirus Real-time-RT-PCR-Kit-Testergebnisse des QCMD-Norovirus-Panels 2008–2011.

Panelcode	Matrix	Stamm	Verdünnungs-faktor	Ergebnis des MutaPLEX® Norovirus
NV08-01	VTM	GII.4	1x10 ⁻³	positiv
NV08-02	VTM	GI.3	1x10 ⁻⁴	positiv
NV08-03	VTM	GII.4	5x10 ⁻³	positiv
NV08-04	VTM	GI.3	5x10 ⁻³	positiv
NV08-05	VTM	GII.4	1x10 ⁻²	positiv
NV08-06	VTM	GI.3	1x10 ⁻²	positiv
NV08-07	VTM	GI.3	1x10 ⁻³	positiv
NV08-08	VTM	negativ		negativ
NV08-09	VTM	GII.4	nn	positiv
NV08-10	TE-Puffer	GIV.1	nn	positiv
NV08-11	TE-Puffer	GII.4	nn	positiv
NV08-12	TE-Puffer	negativ	nn	negativ
NV08-13	TE-Puffer	GI.7	nn	positiv
NV08-14	TE-Puffer	GI.3	nn	positiv
NV09-01	VTM	GII.4	1x10 ⁻⁵	positiv
NV09-02	VTM	GI.3	1x10 ⁻²	positiv
NV09-03	VTM	GII.4	1x10 ⁻²	positiv
NV09-04	VTM	negativ		negativ
NV09-05	VTM	GI.3	1x10 ⁻³	positiv
NV09-06	VTM	GII.4	1x10 ⁻⁴	positiv
NV09-07	VTM	GII.4	1x10 ⁻³	positiv
NV09-08	TE-Puffer	GI.7	1x10 ⁻³	positiv
NV09-09	TE-Puffer	negativ		negativ
NV09-10	TE-Puffer	GI.3	1x10 ⁻³	positiv
NV09-11	TE-Puffer	GII.4	1x10 ⁻³	positiv

Panelcode	Matrix	Stamm	Verdünnungs- faktor	Ergebnis des MutaPLEX® Norovirus
NV09-12	TE-Puffer	GIV.1	1x10 ⁻³	positiv
NV10-01	VTM	GII.4	1x10 ⁻⁴	positiv
NV10-02	VTM	GII.4	1x10 ⁻²	positiv
NV10-03	VTM	GI.3	1x10 ⁻²	positiv
NV10-04	VTM	negativ		negativ
NV10-05	VTM	GI.3	1x10 ⁻¹	positiv
NV10-06	VTM	GII.4	1x10 ⁻¹	positiv
NV10-07	VTM	GII.4	1x10 ⁻³	positiv
NV10-08	TE-Puffer	GI.3	1x10 ⁻³	positiv
NV10-09	TE-Puffer	GIV.1	1x10 ⁻³	positiv
NV10-10	TE-Puffer	GI.7	1x10 ⁻³	positiv

18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

cDNA	komplementäre Desoxyribonuk- leinsäure		Negativkontrolle (K4)
CT	Cycle Threshold		Kontroll-RNA (K5)
nn	nicht bekannt		Zu verwenden mit
PCR	Polymerase-Ket- tenreaktion		Katalognummer
RNA	Ribonukleinsäure		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
RT	Reverse Transkrip- tion		Obere Temperatur- grenze
VLP	Virusähnliche Par- tikel		Hersteller
VTM	Virus-Transport- medium		Verwendbar bis
	Reaktionsmix (K1)		Chargennummer

ENZYME

Enzym (K2)

CONT

Inhalt

CONTROL +

Positivkontrolle
(K3)Arbeitsanleitung
beachten

IVD

In-vitro-Diagnos-
tikum

19. LITERATUR

1. M. K. Koopmans et al.: Genus Norovirus. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo et al.: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Academic Press, London/ San Diego 2005, S. 847f.
2. Robert-Koch-Institut, RKI. Noroviren. www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Noroviren/Noroviren.html

MutaPLEX® Norovirus

real time RT-PCR kit

*Test for the in vitro detection of norovirus RNA (genogroup I
and genogroup II) in stool samples*

Valid from 2016-12-01



KG190132
KG190196



32/96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	18
2	PATHOGEN INFORMATION	18
3	PRINCIPLE OF THE TEST	18
4	PACKAGE CONTENTS	19
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	19
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	20
7	IMPORTANT NOTES	20
8	GENERAL PRECAUTIONS	20
9	SAMPLE MATERIAL	20
10	SAMPLE PREPARATION	21
11	CONTROL RNA (K5)	21
	<i>RNA isolation from stool, food, or environmental samples</i>	21
12	REAL TIME RT-PCR	22
	12.1 <i>Important Points Before Starting</i>	22
	12.2 <i>Procedure</i>	22
13	DATA ANALYSIS	25
14	ASSAY VALIDATION	26
15	LIMITATIONS OF THE METHOD	27
16	TROUBLESHOOTING	27
17	KIT PERFORMANCE	29
	17.1 <i>Diagnostic Sensitivity and Specificity</i>	29
	17.2 <i>Analytical Sensitivity</i>	30
18	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	31
19.	LITERATURE	32

1 INTENDED USE

The MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR™ is an assay for the detection of norovirus RNA (genogroup I and II) in stool, food and environmental samples using real time PCR microplate systems.

2 PATHOGEN INFORMATION

Noroviruses are small non-enveloped RNA viruses belonging to the family of Caliciviridae. They cause approximately 90% of epidemic non-bacterial outbreaks of gastroenteritis around the world.

The viruses are transmitted by fecally contaminated food or water and by person-to-person contact. For this reason, outbreaks of norovirus infection often occur in closed or semi-closed communities, such as long-term care facilities, hospitals, prisons, dormitories, and cruise ships.

Noroviruses are highly contagious and are stable at temperatures between -20 °C to +60 °C and in acidic environments up to pH 3.

Norovirus infections occur throughout the year, however, in Europe, seasonal increases are observed between October and March.

The MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR-Kit detects norovirus strains of high genetic diversity, such as the following:

- GI: Norwalk, Desert Shield, Winchester, Queensarms, Southhampton, Chiba
- GII: Lordsdale, Bristol, Melksham, Toronto, Hawaii

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of norovirus RNA (GI and GII) in stool, food and environmental samples after the extraction of RNA from the sample material.

The reverse transcription (RT) of viral RNA to cDNA and the subsequent amplification of norovirus-specific fragments are performed in an one-step RT-PCR. The amplification can be detected when specific probes are hydrolysed by the polymerase. The presence of nucleic acid is detected by an increase in fluorescence due to hydrolysis of the probes during amplification.

The fluorescence of the pathogen-specific probes is measured in the FAM channel.

Furthermore, MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR kit contains a control RNA (K5), which is added during RNA extraction and detected in the same reaction by a differently labelled probe.

The control RNA (K5) allows the detection of RT-PCR inhibition and acts as control for the isolation of the nucleic acid from the clinical specimen.

The fluorescence of the control RNA (K5) is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG190132) or 96 (KG190196) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR kit.

	Label	Lid Colour	Content	
			32	96
K1	Reaction Mix	yellow	1 x 506 µl	2 x 759 µl
K2	Enzyme	blue	1 x 6.4 µl	1 x 19.2 µl
K3	Positive control	red	1 x 50 µl	1 x 100 µl
K4	Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 100 µl
K5	Control RNA	colourless	1 x 160 µl	2 x 240 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- RNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid
- Optional: Liquid handling system for automation
- Optional: VLP-RNA (virus-like particles, please see chapter 11 for details).

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR-Kit is shipped on dry ice or cool packs. All components must be stored at maximum -18°C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8°C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

7 IMPORTANT NOTES

- The MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

8 GENERAL PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the RT-PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR-Kit components of different lot numbers.

9 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR is viral RNA isolated from clinical specimens (stool, food, or environmental samples).

10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR is suitable for the detection of norovirus RNA isolated from clinical specimens with appropriate isolation methods.

Commercial kits for RNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) are recommended.

Stool samples

Suspend some stool sample (approx. the size of a pea) in 1.5 ml ultra pure water. Vortex well. Once the solid components have sunken to the bottom of the tube (where necessary centrifuge for 5 min at 3 500 g), use the supernatant for extraction.

Very liquid stool samples can be used for extraction without further suspension in water. Also vortex well and wait for the solid components to sink to the bottom of the tube (where necessary centrifuge for 5 min at 3 500 g).

Important: In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control RNA (K5) in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time RT-PCR. Furthermore, possible contaminations during RNA extraction will be detectable.

Please note chapter 11 “Control RNA”.

If the real time RT-PCR is not performed immediately, store extracted RNA according to the instructions given by the RNA extraction kit’s manufacturer.

11 CONTROL RNA (K5)

A control RNA (K5) is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the RNA isolation procedure and to check for possible real time RT-PCR inhibition.

The virus-like particles (VLP-RNA) are not supplied.

RNA isolation from stool, food, or environmental samples

a) Control RNA (K5) or VLP-RNA used as extraction control

MutaPLEX® Norovirus control RNA (K5) or VLP-RNA is added to the RNA extraction.

Add 5 µl control RNA (K5) or VLP-RNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the RNA isolation according to the manufacturer’s instructions. Please follow protocol A.

The control RNA (K5) must be added to the lysis buffer of the extraction kit.

b) Control RNA (K5) used as internal control of the real time RT-PCR

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

12 REAL TIME RT-PCR

12.1 Important points before starting

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.
- Before setting up the real time RT-PCR familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the RT-PCR set up.
- In every RT-PCR run, one positive control (K3) and one negative control (K4) should be included.
- Before each use, all reagents – except the enzyme (K2) – should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed (do NOT vortex the reaction mix (K1) but mix by pipetting up and down repeatedly), and centrifuged very briefly.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

12.2 Procedure

If the control RNA (K5) or VLP-RNA is used to control both, the real time RT-PCR and the RNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control RNA (K5) is solely used to detect possible inhibition of the real time RT-PCR, please follow protocol B.

Protocol A

The control RNA (K5) or VLP-RNA was added during RNA extraction (see chapter 11 “Control RNA”). In this case, prepare the master mix according to table 2.

The master mix contains all of the components needed for RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control RNA (K5) was added during RNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
15.8 µl Reaction Mix (K1)	15.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme (K2)	0.2 µl x (N+1)

Protocol B

The control RNA (K5) is used for the control of the real time RT-PCR only (see chapter 11 "Control RNA"). In this case, prepare the master mix according to table 3.

The master mix contains all of the components needed for real RT-PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 3: Preparation of the master mix (control RNA (K5) is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
15.8 µl Reaction Mix (K1)	15.8 µl x (N+1)
0.2 µl Enzyme (K2)	0.2 µl x (N+1)
0.2 µl Control RNA (K5)*	0.2 µl x (N+1)*

*The increase in volume caused by adding the control RNA is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

Protocol A and B: real time RT-PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.
- Pipet 16 µl of the master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add 4 µl of the eluates from the RNA isolation (including the eluate of the water control), the positive control (K3) and the negative control (K4) to the corresponding optical PCR reaction tube (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the real time RT-PCR

Component	Volume
Master mix	16.0 µl
Sample	4.0 µl
Total volume	20.0 µl

For the real time RT-PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: real time RT-PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse Transcription	10 min	45 °C	1
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of DNA			45 Aquisition at the end of this step
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing	40 s	60 °C	

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR.

Real time RT-PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes	
LightCycler 480I	Norovirus control RNA	483-533 523-568	Color compensation kit needed, e.g. Universal CC FAM (510) – VIC (580)	
LightCycler 480II	Norovirus control RNA	465-510 533-580		
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	Norovirus control RNA	FAM HEX	Gain 8 Gain 1	Reference Dye: None
ABI 7500	Norovirus control RNA	FAM JOE	Option Reference Dye ROX: NO	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	Norovirus control RNA	Green Yellow	Gain 5 Gain 5	

13 DATA ANALYSIS

The norovirus-specific amplification is measured in the FAM channel. The amplification of the control RNA (K5) is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

The following results can occur:

- **A signal in the FAM channel is detected:**

The result is positive, the sample contains norovirus RNA.

In this case, detection of a signal of the control RNA (K5) in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is inessential, as high concentrations of cDNA may reduce or completely inhibit amplification of the control RNA (K5).

- **No signal in the FAM channel, but a signal in the VIC®/HEX/JOE/TET channel is detected:**

The result is negative, the sample does not contain norovirus RNA.

The signal of the control RNA (K5) excludes the possibilities of RNA isolation failure (in case the control RNA (K5) is being used as an extraction control) and/or real time RT-PCR inhibition. If the CT value of a sample differs significantly from the CT value of the water control, a partial inhibition occurred, which can lead to negative results in weak positive samples (see „Troubleshooting“).

- **Neither in the FAM nor in the VIC®/HEX/JOE/TET channel a signal is detected:**

A diagnostic statement cannot be made.

The RNA isolation was not successful or an inhibition of the RT-PCR has occurred. In case the control RNA (K5) was added during RNA isolation and not directly to the PCR master mix, the negative control (K4) is negative in both channels.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time RT-PCR results.

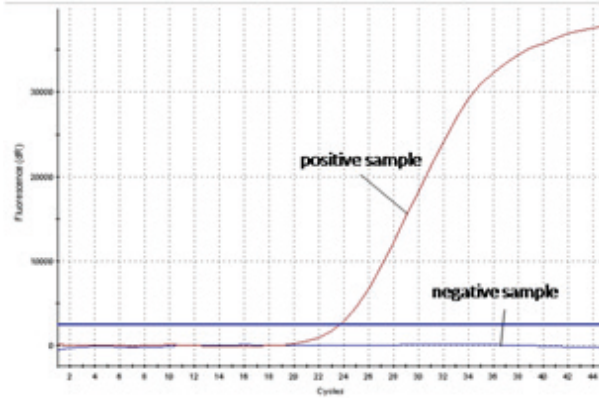


Figure 1: The positive sample shows virus-specific amplification in the FAM channel, whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

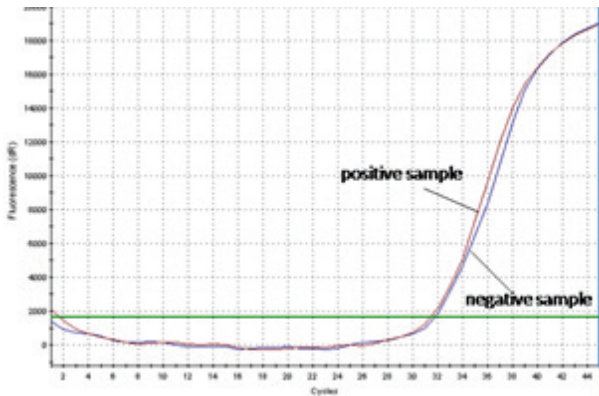


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control RNA-specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The amplification signal of the control RNA (K5) in the negative sample shows that the missing signal in the virus-specific FAM channel is not due to RT-PCR inhibition or failure of RNA isolation, but that the sample is a true negative.

14 ASSAY VALIDATION

Set a threshold as follows:

Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in speci-

mens at high CT – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

Positive controls

All the positive controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The positive controls must fall below a CT of 30.

Internal controls

All internal controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The internal control must fall below a CT of 33. If the internal control is above CT 34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IC. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the IC must fall below a CT of 33.

15 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

A negative test result does not exclude a norovirus infection.

16 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time RT-PCR.

No fluorescence signal in the FAM channel of the positive control (K3)

The selected channel for analysis does not comply with the protocol

Select the FAM channel for analysis of the virus-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control RNA (K5).

Incorrect configuration of the real time RT-PCR

Check your work steps and compare with chapter “Procedure”.

The programming of the thermal profile is incorrect

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

Weak or no signal of the control RNA (K5) and simultaneous absence of a signal in the virus-specific FAM channel***real time RT-PCR conditions do not comply with the protocol***

Check the real time RT-PCR conditions (chapter 12).

real time RT-PCR inhibited

Make sure that you use an appropriate isolation method (see “Sample preparation”) and follow the manufacturer’s instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the RNA.

RNA loss during isolation process

In case the control RNA (K5) was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the RNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer’s protocol.

Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

Detection of a fluorescence signal in the FAM channel of the negative control (K4)***Contamination during preparation of the RT-PCR***

Repeat the real time RT-PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control (K3) last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time RT-PCR.

17 KIT PERFORMANCE

17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity

During the validation study of the MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR kit, 45 positive and 50 negative samples were tested. The diagnostic sensitivity was found to be 100% and the diagnostic specificity 100% (tables 7 and 8). Furthermore, in silico analysis of primers and probes showed no cross-reactivities to sequences of other gastroenteric pathogens.

The positive predictive value was found to be 100%, the negative predictive value showed to be 100%.

Table 7: Overview of the amount of samples tested and the resulting positive and negative predictive values

	positive samples	negative samples
MutaPLEX® Norovirus positive	45	0
MutaPLEX® Norovirus negative	0	50
Sensitivity	100%	
Specificity	100%	

Table 8: Diagnostic Specificity

Virus/Bacterium	No of strains tested	Result
Norovirus	6 + 39 clinical samples	positive
Enterovirus	11	negative
Adenovirus	1	negative
Rotavirus	1	negative
Astrovirus	1	negative
Sapovirus	1	negative
Listeria monocytogenes	1	negative
Campylobacter	1	negative
Citobacter	1	negative
Salmonella	1	negative
E. coli	1	negative

17.2 Analytical Sensitivity











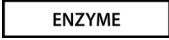

The analytical sensitivity of MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR kit was determined using round robin samples of QCMD ring trials. Table 9 shows the results of the tests. All of the positive samples could be detected even in the highest dilutions.

Table 9: Results of testing of QCMD Norovirus Panels 2008-2011 with MutaPLEX® Norovirus real time RT-PCR kit.

Panel Code	Matrix	Strain	Dilution Factor	Result MutaPLEX® Norovirus
NV08-01	VTM	GII.4	1x10 ⁻³	positive
NV08-02	VTM	GI.3	1x10 ⁻⁴	positive
NV08-03	VTM	GII.4	5x10 ⁻³	positive
NV08-04	VTM	GI.3	5x10 ⁻³	positive
NV08-05	VTM	GII.4	1x10 ⁻²	positive
NV08-06	VTM	GI.3	1x10 ⁻²	positive
NV08-07	VTM	GI.3	1x10 ⁻³	positive
NV08-08	VTM	negative		negative
NV08-09	VTM	GII.4	nn	positive
NV08-10	TE-Puffer	GIV.1	nn	positive
NV08-11	TE-Puffer	GII.4	nn	positive
NV08-12	TE-Puffer	negative	nn	negative
NV08-13	TE-Puffer	GI.7	nn	positive
NV08-14	TE-Puffer	GI.3	nn	positive
NV09-01	VTM	GII.4	1x10 ⁻⁵	positive
NV09-02	VTM	GI.3	1x10 ⁻²	positive
NV09-03	VTM	GII.4	1x10 ⁻²	positive
NV09-04	VTM	negative		negative
NV09-05	VTM	GI.3	1x10 ⁻³	positive
NV09-06	VTM	GII.4	1x10 ⁻⁴	positive
NV09-07	VTM	GII.4	1x10 ⁻³	positive
NV09-08	TE-Puffer	GI.7	1x10 ⁻³	positive
NV09-09	TE-Puffer	negative		negative
NV09-10	TE-Puffer	GI.3	1x10 ⁻³	positive
NV09-11	TE-Puffer	GII.4	1x10 ⁻³	positive
NV09-12	TE-Puffer	GIV.1	1x10 ⁻³	positive

Panel Code	Matrix	Strain	Dilution Factor	Result MutaPLEX® Norovirus
NV10-01	VTM	GII.4	1x10 ⁻⁴	positive
NV10-02	VTM	GII.4	1x10 ⁻²	positive
NV10-03	VTM	GI.3	1x10 ⁻²	positive
NV10-04	VTM	negative		negative
NV10-05	VTM	GI.3	1x10 ⁻¹	positive
NV10-06	VTM	GII.4	1x10 ⁻¹	positive
NV10-07	VTM	GII.4	1x10 ⁻³	positive
NV10-08	TE-Puffer	GI.3	1x10 ⁻³	positive
NV10-09	TE-Puffer	GIV.1	1x10 ⁻³	positive
NV10-10	TE-Puffer	GI.7	1x10 ⁻³	positive

18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

cDNA	complementary Deoxyribonucleid Acid		Negative control (K4)
CT	Cycle Threshold		Control RNA (K5)
nn	not known		To be used with
PCR	Polymerase Chain Reaction		Catalog number
RNA	Ribonucleid Acid		Contains sufficient for <n> test
RT	Reverse Transcription		Upper limit of temperature
VLP	Virus-Like Particles		Manufacturer
VTM	Virus Transport Medium		Use by
	Reaction Mix (K1)		Lot number
	Enzyme (K2)		Content



Positive control
(K3)



Consult instruc-
tions for use



In vitro diagnostic
medical device

19. LITERATURE

1. M. K. Koopmans et al.: Genus Norovirus. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo et al.: Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Academic Press, London/ San Diego 2005, S. 847f.
2. Robert-Koch-Institut, RKI. Noroviren. www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Noroviren/Noroviren.html