

Vitassay qPCR

Noro (I&II)

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y la identificación de los genotipos GI y/o GII de Norovirus en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and identification of GI and/or GII Norovirus genotypes in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Noro (I&II) permite la detección cualitativa y la identificación de RNA genómico específico de los genotipos I (GI) y II (GII) de Norovirus en muestras fecales. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por Norovirus GI y/o GII junto con los datos clínicos del paciente, los factores de riesgo epidemiológico, y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR Noro (I&II) 4x8-well strip, low profile	7041070
Vitassay qPCR Noro (I&II) 4x8-well strip, high profile	7042070

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S070/ 7042S070	Noro (I&II) strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C070	Noro (I&II) Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (- 30°C a - 10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)

- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

El Norovirus humano (HNoV) es un virus de ARN lineal de sentido positivo de la familia *Caliciviridae* cuya longitud es de ~7,6 kb. El genoma está unido covalentemente al genoma de la proteína viral (VPg) en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. ORF-1, ORF-2 y ORF-3 son tres marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican ocho proteínas virales. ORF-2 y ORF-3 codifican la proteína de la cápside mayor VP1 y la proteína de la cápside menor VP2, respectivamente. Estas son componentes estructurales del virión. El ORF-1 codifica una poliproteína que se procesa proteolíticamente en seis proteínas no estructurales, incluyendo la proteasa del Norovirus y la ARN polimerasa dependiente del ARN.

Los HNoV son genética y antigénicamente divergentes y la principal causa de gastroenteritis aguda en personas de todas las edades en todo el mundo, asociada a unas 70.000-200.000 muertes anuales. La secuencia de aminoácidos de la VP1, que la divide en, al menos, 6 genogrupos (genogrupo I [GI] a GVI) y más de 40 genotipos, es responsable de su gran diversidad. Las infecciones por HNoV son causadas por el GI (sobre todo el GI.4), el GII y, en menor medida, el GIV (algunos de sus genotipos infectan también a los cerdos).

El HNoV se identificó por primera vez en muestras de heces recogidas durante un brote de gastroenteritis en Norwalk, OH, y fue el primer agente viral causante de gastroenteritis. Al año, los HNoV son responsables de 64.000 episodios diarreicos que requieren hospitalización, 900.000 visitas a clínicas entre los niños en países desarrollados y 200.000 muertes de niños menores de cinco años en países en desarrollo.

El mecanismo de transmisión más común es la vía fecal-oral, pero existen rutas alternativas como las partículas virales en forma de aerosoles en el vómito, los alimentos, el agua y la contaminación ambiental. Los entornos cerrados, como los hospitales, las residencias de ancianos, los centros de atención sanitaria y de larga duración, el ejército, los conciertos, los eventos y los cruceros, es donde se libera el mayor número de partículas víricas. El tiempo de incubación suele encontrarse en ~48 h y algunos de los síntomas de la infección por HNoV son náuseas, vómitos, diarrea, fiebre baja, calambres abdominales, anorexia, malestar general, dolor de cabeza, escalofríos. Generalmente son síntomas breves en el tiempo.

La RT-PCR es el estándar de oro para la detección y tipificación de norovirus, y se han desarrollado numerosos ensayos de RT-PCR convencionales y en tiempo real para detectar Norovirus.

Principio del test

Vitassay qPCR Noro (I&II) se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de ORF1-ORF2 del genoma de Norovirus GI y Norovirus GII. Tras la extracción de RNA, la presencia de los virus se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5' - 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Noro (I&II), se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Los pocillos contienen la mezcla de reacción multiplex para la detección de genes de Norovirus GI y Norovirus GII, así como el Control Interno (CI). Tras la reacción de amplificación, Norovirus GI se detecta en el canal Cy5, Norovirus GII en el canal FAM, y el control interno en el canal HEX, VIC o JOE (dependiendo del equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.

- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA

Para la recogida, la conservación y el transporte de las muestras deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR Noro (I&I) ha sido probado en muestras fecales humanas. El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medios de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Para conservarse durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20°C. La muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas.

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real.

Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes sistemas de extracción han sido validados:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Noro (I&I) Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Retrotranscripción	45°C	15 min	1
Activación de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Norovirus GII), Cy5 (Norovirus GI), y HEX, JOE o VIC (Control

Interno). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Utilice la curva de amplificación del control positivo como punto de partida durante la validación de la reacción (antes de la interpretación de los resultados de las muestras), para garantizar que el threshold se sitúe dentro de la fase exponencial de las curvas de amplificación y por encima de cualquier señal de ruido de fondo. El valor de threshold puede variar entre distintos instrumentos debido a las diferentes intensidades de señal. Se recomienda establecer los valores de threshold para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación ($Ct \leq 40$) en los canales FAM, y Cy5.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct > 40$ o no señal) de FAM, y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

Norovirus GII (FAM)	Norovirus GI (Cy5)	Control Interno (HEX)	Interpretación	
+	+	+/-	Válido	Norovirus GI y GII detectados
-	-	+/-	Válido	Norovirus GI y GII no detectados
+	-	+/-	Válido	Norovirus GII detectado, Norovirus GI no detectado
-	+	+/-	Válido	Norovirus GI detectado, Norovirus GII no detectado
+	+	+	Inválido	Dianas no detectados
-	-	-	Inválido	Test fallido

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 40 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Se recomienda también repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado, en función del material disponible (obtener un nuevo espécimen y volver a testar, volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, repetir RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada).

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

La sensibilidad y especificidad clínica de Vitassay qPCR Noro (I&II) se evaluó con 79 muestras fecales de pacientes sintomáticos.

La extracción de las muestras de RNA se realizó con el kit de extracción Invisorb® Spin Universal Kit (batch TA150018, Expiry date 2017-03, (Invitek Molecular), siguiendo las instrucciones de uso y el termociclador utilizado fue el RIDA®GENE Norovirus I&II (r-Biopharm) and Vitassay qPCR Noro (I&II). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
Norovirus GI	15	59	5*	0	1 (0.74-1)	0.92 (0.81-0.97)	0.75 (0.50-0.90)	1 (0.92-1)
Norovirus GII	47	29	3*	0	0.90 (0.73-0.97)	0.94 (0.82-0.98)	0.94 (0.82-0.98)	1 (0.85-1)

TP: Verdadero positivo; TN: Verdadero Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo; SE: Sensibilidad; SP: Especificidad; PPV= Valores Predictivos Positivos; NPV = Valores Predictivos Negativos. *La baja cantidad de RNA molde detectado en estas muestras está por debajo del límite de detección del método utilizado.

Tras el análisis con Vitassay qPCR Noro (I&II), el patógeno Norovirus GI fue detectado en 20 muestras, 5 más que en el kit comparador. En el caso del patógeno Norovirus GII fue detectado en 50 muestras, 3 más que en el kit comparador.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar estos patógenos utilizando Vitassay qPCR Noro (I&II).

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de RNA por reacción para Norovirus GI y Norovirus GII (tasa positividad 95%).

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de Norovirus GI y GII fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas con ninguna de las especies:

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

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Noro (I&II) para Norovirus GI se evaluó frente a los genótipos GI.1, GI.3, GI.7, GI.8 y GI.Pb, mostrando resultados positivos.

La reactividad de Vitassay qPCR Noro (I&II) para Norovirus GII se evaluó frente a GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, GII.17, GII.21, GII.b, GII.P4, GII.P17, GII.P21, GII.P16_GII.4.2012 recombinante, GII.P16_GII.2 recombinante, GII.Pe, GII.Pe_GII.4 y GII.Pg_GII.1, mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Noro (I&II) ha sido validado en los siguientes equipos:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con RNA extraído de especímenes fecales humanos. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el Noro (I&II) positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- Los valores de fluorescencia pueden variar por múltiples factores como: equipo de PCR, sistema de extracción, tipo de muestra, y su tratamiento previo, entre otros.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾
Azure Cielo 6
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}
LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}

Formatos especiales ⁽⁷⁾
Bio Molecular Systems
Mic Real Time PCR Cycler
Cepheid
SmartCycler®
Precision System Science Co., Ltd.
geneLEAD VIII System
Qiagen
Rotor-Gene® Q

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 ⁽¹⁾
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena
qTOWER
BIONEER
Exicycler™ 96
BIOER
QuantGene 9600
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽⁸⁾
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
QIAquant 96

- (1) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos de PCR a tiempo real.
- (2) Seleccionar Ramp Speed "Standard".
- (3) No lectura en canal ROX.
- (4) No lectura en canal Cy5.
- (5) Lectura solo en canales FAM y HEX.
- (6) Se requiere compensación de color específica.
- (7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q o geneLEAD VIII System.
- (8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. Canales de detección de los equipos a tiempo real más comunes

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480 II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition"
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Intended use

Vitassay qPCR Noro (I&II) allows the qualitative detection and identification of genomic RNA specific to Norovirus genotypes I (GI) and II (GII) in fecal samples. This product is intended to aid in the diagnosis of Norovirus GI and/or GII infections, alongside the patient's clinical data, epidemiological risk factors, and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Noro (I&II) 4x8-well strip, low profile	7041070
Vitassay qPCR Noro (I&II) 4x8-well strip, high profile	7042070

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S070/ 7042S070	Noro (I&II) strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C070	Noro (I&II) Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4 x 8-cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)

- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Human norovirus (HNoV) is a *Caliciviridae* family linear, positive-sense RNA virus whose length is ~7.6 kb. The genome is covalently linked to the viral protein genome (VPg) at the 5' end and polyadenylated at the 3' end. ORF-1, ORF-2 and ORF-3 are three open reading frames (ORFs) that encode eight viral proteins. ORF-2 and ORF-3 encode the major capsid protein VP1 and the minor capsid protein VP2, respectively, which are structural components of the virion. ORF-1 encodes a polyprotein that is proteolytically processed into six non-structural proteins, including the norovirus protease and RNA-dependent RNA polymerase.

HNoV are genetically and antigenically divergent and the leading cause of acute gastroenteritis in people of all ages worldwide associated with an estimated 70,000-200,000 deaths annually. VP1 amino acid sequence, which divides it into at least 6 genogroups (genogroup I [GI] to GVI) and >40 genotypes, is responsible for their great diversity. HNoV infections are caused, in decreasing order of frequency, by GII (mostly GII.4), GI and, to a very limited extent, GIV (some genotypes of which also infect pigs).

HNoV was first identified in stool specimens collected during an outbreak of gastroenteritis in Norwalk, OH, and was the first viral agent shown to cause gastroenteritis. HNoV are responsible for 64,000 diarrheal episodes requiring hospitalization, 900,000 clinic visits among children in developed countries, and 200,000 deaths of children under the age of five in the developing world per year.

The most common transmission mechanism is the faecal-oral route, but alternative routes have been described such as aerosolised viral particles in vomitus, and through food, water, and environmental contamination. Closed environments such as hospitals, nursing homes, long-term care and healthcare facilities, the military, concerts, events, and cruise-ships, is where is released highest number of viral particles. The time of incubation is assessed to be of ~48 h and some of the symptoms of the HNoV infection are nausea, vomiting, diarrhoea, low-grade fever, abdominal cramps, anorexia, malaise, headache, chills. They are generally of a relatively short duration.

RT-PCR is the gold standard for the detection and typing of norovirus, and numerous conventional and real-time norovirus RT-PCR assays have been developed.

Principle of the test

Vitassay qPCR Noro (I&II) is based on real-time amplification of a conserved ORF1-ORF2 region of the Norovirus GI and Norovirus GII genome. After RNA extraction, the presence of the viruses is detected by an increase in fluorescence observed during the reaction, following hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect the accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to extend the primers, the probe is hydrolysed by its 5'-3' exonuclease activity resulting in spatial separation of the fluorophore and the quencher. The resulting increase in fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR Noro (I&II) is a ready-to-use test that contains in each well all the necessary reagents in a stabilised format to perform real-time PCR. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. The wells contain the multiplex reaction mixture for the detection of Norovirus GI and Norovirus GII genes as well as the Internal Control (IC). Following the amplification reaction, Norovirus GI is detected in the Cy5 channel, Norovirus GII in the FAM channel, and the internal control in the HEX, VIC, or JOE channel (depending on the equipment used).

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.

- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Sample collection, preparation, and RNA extraction

For specimen collection, conservation, and transport, user-validated conditions must be followed. Vitassay qPCR Noro (I&II) has been tested on human fecal samples. Other sample types should be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected appropriately in clean containers with or without transport media (depending on sample type), correctly labelled and promptly processed to ensure the test's quality. Use of fresh samples for the test is also recommended. For longer storage, the samples must be frozen at -20°C. The sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

For nucleic acid isolation from clinical specimens, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The following extraction kits have been validated:

Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Noro (I&II) Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Retrotranscription	45°C	15 min	1
Polymerase activation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (Norovirus GI), Cy5 (Norovirus GII), and HEX, JOE, or VIC (Internal Control). Depending on the equipment used select the proper detection channel (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

Use the positive control amplification curve as a starting point during reaction validation (prior to interpretation of sample results), to ensure that the threshold falls within the exponential phase of the amplification curves and above any background noise signals. The threshold value may vary between different instruments due to different signal intensities. It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end user.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve ($Ct \leq 40$) in FAM, and Cy5 channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence ($Ct > 40$ or no signal) in FAM, and Cy5, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal ($Ct \leq 40$) in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

<i>Norovirus GII (FAM)</i>	<i>Norovirus GI (Cy5)</i>	<i>Internal Control (HEX)</i>	Interpretation	
+	+	+/-	Valid	Norovirus GI and GII detected
-	-	+/-	Valid	Norovirus GI and GII not detected
+	-	+/-	Valid	Norovirus GII detected and Norovirus GI not detected
-	+	+/-	Valid	Norovirus GI detected and Norovirus GII not detected
+	+	+	Invalid	Targets not detected
-	-	-	Invalid	Failed test

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

If there is a signal' absence or Ct value > 40 of Internal Control, the result is considered 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR by diluting the RNA sample 1:10, or to re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each RT-qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate, depending on the available material (repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample, or re-extract and retest another aliquot of the same specimen or, obtain a new specimen and retest).

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

The clinical sensitivity and specificity of Vitassay qPCR Noro (I&II) was evaluated on 79 faecal samples from symptomatic patients.

RNA samples were extracted with the Invisorb® Spin Universal Kit (Batch TA150018, expiry date 2017-03, Invitex Molecular), following the instructions for use and the PCR thermal cycler used was the RIDA®GENE Norovirus I&II (r-Biopharm) and Vitassay qPCR Noro (I&II). The results obtained were as follows:

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
Norovirus GI	15	59	5*	0	1 (0.74-1)	0.92 (0.81-0.97)	0.75 (0.50-0.90)	1 (0.92-1)
Norovirus GII	47	29	3*	0	0.90 (0.73-0.97)	0.94 (0.82-0.98)	0.94 (0.82-0.98)	1 (0.85-1)

TP: True Positive; TN: True Negative; FP: False Positive; FN: False Negative; SE: Sensitivity; SP: Specificity; PPV = Positive Predictive Value; NPV = Negative Predictive Value. *The low amount of RNA template in these stool samples is below the detection limit of the method used.

After analysis with Vitassay qPCR Noro (I&II), the pathogen Norovirus GI was detected in 20 samples, 5 more than in the comparator kit. The Norovirus GII pathogen was detected in 50 samples, 3 more than in the comparator kit.

The results show a high sensitivity and specificity to detect these pathogens using Vitassay qPCR Noro (I&II).

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 10^7 to 10^1 copies/reaction. This assay has a detection limit of 10 RNA copies per reaction for Norovirus GI and Norovirus GII (positive rate of 95%).

Analytical specificity

The analytical specificity for Norovirus GI and GII detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species.

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

Analytical reactivity

Vitassay qPCR Noro (I&II) reactivity for Norovirus GI was tested against genotypes GI.1, GI.3, GI.7, GI.8 and GI.Pb, showing positive results.

Vitassay qPCR Noro (I&II) reactivity for Norovirus GII was assessed against RNA extracted from clinical samples and mock clinical samples positive for Norovirus genotypes GII.1, GII.2, GII.3, GII.4, GII.4 New Orleans 2009, GII.4 Sydney 2012, GII.5, GII.6, GII.7, GII.10, GII.12, GII.13, GII.16, GII.17, GII.21, GII.b, GII.P4, GII.P16, GII.P17, GII.Pe, GP.Pg, GII.P21, GII.P16_GII.4 .2012 recombinant, GII.P16_GII.2 recombinant, GII.Pe_GII.4.2012 and GII.Pg_GII.1, showing positive results.

Compatible real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Noro (I&II) has been validated on the following equipment:

- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

Limitations

- All obtained results should be interpreted by a specialist in conjunction with available clinical information and laboratory findings.
- This assay has been validated with RNA extracted from human fecal specimens. The use of other samples has not been established.
- The correct test performance depends on the sample's quality; RNA should be properly extracted from clinical samples. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This test is a qualitative assay.
- Low copy numbers of the target RNA template may be detected below the detection limit, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination, either by Noro (I&II) positive control during reconstitution, by samples containing high concentrations of target RNA template or by PCR products from previous reactions.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type and its previous treatment, among others.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ^{(3) (1)}
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	7900 Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁴⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽³⁾
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Azure Biosystems	Agilent Technologies
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	Mx3000P™ Real Time PCR System
Azure Cielo 6	Mx3005P™ Real Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96	qTOWER
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	BIOER
Roche	QuantGene 9600
LightCycler @480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	Bio-Rad
LightCycler @96 Real-Time PCR System ⁽¹⁾	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ Real-Time PCR
	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclers	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Precision System Science Co., Ltd.	Qiagen
geneLEAD VIII System	QIAquant 96
Qiagen	
Rotor-Gene® Q	

- (1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.
- (2) Select Ramp Speed "Standard".
- (3) No ROX caption.
- (4) No Cy5 caption.
- (5) Only FAM and HEX caption.
- (6) Specific compensation color is required.
- (7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, Rotor-Gene® Q or geneLEAD VIII System.
- (8) See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx 3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

*If result in FAM channel is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

Bibliography/Bibliografía

Chhabra P., de Graaf M., Parra GI., Chan MC., Green K., Martella V., Wang Q., White PA., Katayama K., Vennema H., Koopmans M., & Vinjé J. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *The Journal of general virology*, 100(10), 1393–1406.

Graziano VR., Wei J., & Wilen CB. (2019). Norovirus Attachment and Entry. *Viruses*, 11(6), 495.










Randazzo, W., D'Souza, D. H., & Sanchez, G. (2018). Norovirus: The Burden of the Unknown. *Advances in food and nutrition research*, 86, 13–53.

Robilotti E., Deresinski S., & Pinsky BA. (2015). Norovirus. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 134–164.

Trademarks

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
			Número de referencia Catalogue number



VA Vitassay

Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com