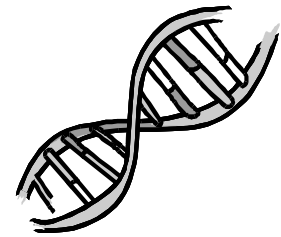




MutaREAL[®] Norovirus

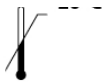
real time RT-PCR Kit



Qualitativer Test für den spezifischen Nachweis von **Noroviren** (Genogruppe I und II) im *real time* PCR-Kapillarsystem (z. B. LightCycler[®], Roche^{*}).

REF KV2934124 
24

REF KV2934196 
96



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

Nur für in vitro Diagnostik



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

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



1. VERWENDUNGSZWECK

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

2. EINLEITUNG

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

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

GGI: *Norwalk, Southampton, Queens Arms, Desert Shield, Winchester, Sindlesham, Ciba*

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

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

3. TESTPRINZIP

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

Der erste Schritt des Norovirusnachweis ist eine **reverse Transkription (RT)**, in welcher das virale ssRNA-Genom in cDNA umgeschrieben wird. Anschließend werden mit einer thermostabilen DNA-Polymerase mittels Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) die für **Norovirus I** bzw. **II** spezifischen Genfragmente amplifiziert. Die **Zielsequenz** für die Detektion befindet sich in der Region innerhalb der **ORF1 / ORF 2 - junction**.

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

Zudem überprüft eine in jede Reaktion eingeschlossene **interne Kontrolle**, welche parallel zu den Proben co-amplifiziert und detektiert wird, eine mögliche Inhibition von **reverser Transkription (RT)** bzw. der **PCR**. Die Detektion der amplifizierten internen Kontrolle wird bei **705 nm** durchgeführt (z.B. LightCycler[®] Fluorimeter-Kanal F3 bei 1.5 bzw. F6 bei 2.0).

4. KITBESTANDTEILE

Jeder Testkit enthält Reagenzien zur Durchführung von **24** bzw. **96** Bestimmungen, sowie eine Gebrauchsanleitung.

Ref.	Reagenz	Konfektion 24		Konfektion 96		Deckelfarbe
A1	Enzym-Mix	1x	30 µl	1x	90 µl	blau
A2	Primer-/ Sonden-Mix	1x	400 µl	2x	750 µl	gelb
A3	Positivkontrolle	1x	20 µl	1x	50 µl	rot
A4	Negativkontrolle	1x	200 µl	1x	200 µl	grün

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

Benötigte Materialien - mitgeliefert:

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

Benötigte Materialien - nicht mitgeliefert:

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

6. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Alle Reagenzien (A1 bis A4) sollten **bis zum unmittelbaren Gebrauch bei <-20°C** gelagert und dann **schonend** (bei 8°C im Kühlschrank) aufgetaut werden.
- Ein **mehrfaches Auftauen/ Einfrieren** der Reagenzien A1, A2, und A3 ist **unbedingt zu vermeiden** (bei Bedarf nach dem erstmaligem Auftauen **geeignete Aliquots** herstellen und die Reagenzien dann **sofort** wieder einfrieren).
- Während der PCR-Vorbereitung alle Arbeitsschritte zügig in einem Kryobehälter (z.B. Light Cycler® Cooling Block) durchführen bzw. alle Reagenzien stets **geeignet kühlen**.
- Primer-/ Sonden-Mix (A2) stets vor **Lichtkontakt schützen**.
- Alle Reagenzien können bis zum Ablauf des (auf der Kit-Packung angegebenen) Mindesthaltbarkeitsdatum verwendet werden.

7. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- **MutaREAL® Norovirus** ist **Roche-lizenziert**, d. h. es sind **keine** weiteren Gebühren (z. B. für „reported-results“) mehr erforderlich.
- Dieser Test muss durch speziell in Molekularbiologie-Techniken geschultes Personal durchgeführt werden.
- Die klinischen Proben müssen als potentiell infektiöses Material angesehen und entsprechend auch entsorgt werden.
- Die Regeln der Good Laboratory Practice (GLP) müssen eingehalten werden.
- Testkit nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatum nicht mehr verwenden.

AMPLIFIKATION

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

- 1) Bereich, in dem die Proben vorbereitet und die Reagenzien angesetzt werden.
- 2) Bereich für die Amplifikation und deren Detektion.

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

- Sterile Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzen.
- Für jeden Arbeitsplatz neue Handschuhe und Kittel benutzen.
- Dekontaminieren Sie in regelmäßigen Abständen Ihre Pipetten und Laborbänke mit Dekontaminationslösung.
- Vermeiden Sie Aerosolbildung.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Die gesamte Durchführung ist in folgende drei Schritte aufgeteilt:

- A) RNA-Extraktion (aus Stuhlproben).
- B) Reverse Transkription der RNA und nachfolgende Amplifikation/ kombinierte Detektion der entstandenen cDNA-Templates mittels der Hybridisierungssonden.
- C) Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Software des verwendeten *real time* PCR-Kapillarsystems.

A) RNA-EXTRAKTION

- 1) Die Extraktion viraler RNA wird mit Hilfe eines **kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungs-Kits** (z. B. High Pure Viral RNA Kit, **Roche**) aus Stuhlproben durchgeführt und erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers. Dazu die Stuhlprobe mit ca. 1 ml Reinstwasser (keine Puffer verwenden) aufschwemmen und nach Absinken der festen Bestandteile den Überstand als Ausgangsmaterial verwenden.
- 2) Falls die *real time* PCR nicht sofort durchgeführt wird, **müssen** die Proben bei **< -20°C** aufbewahrt werden.

B) REAL TIME Norovirus RT-PCR PROTOKOLL

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

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

Alle Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen!

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

- 2) Die Reagenzien (Enzym-Mix, A1 und Primer-/Sonden-Mix, A2) in einem sterilen Reaktionsgefäß vorsichtig durch **mehrmaliges Auf- und Abpipettieren (ca. 15 – 20 x) gut mischen (NICHT VORTEXEN !)**: Diese Mischung stellt den Master-Mix dar - diesen kurz in einer Tischzentrifuge abzentrifugieren, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln!
- 3) **15 µl** des Master-Mix mit einer Mikropipette und sterilen Filterspitzen in jedes PCR-Reaktionsgefäß (z.B. LightCycler® Kapillare) pipettieren.
5 µl der Proben-RNA bzw. der Positiv- und Negativkontrollen (A3 und A4) zu den jeweilig korrespondierenden PCR-Reaktionsgefäßen zugeben (es empfiehlt sich, die Kapillaren der Proben jeweils unverzüglich nach Befüllung zu verschließen und die Negativ-Kontrolle als Kontaminationskontrolle zwar zuerst zu pipettieren, aber erst als letzte zu verschließen).
- 4) Die Reagenzien in den PCR-Reaktionsgefäßen durch kurzes Zentrifugieren am Gefäßboden sammeln (für Kapillaren LightCycler® Kapillar-Zentrifuge verwenden).
- 5) Folgendes **real time RT-PCR - Protokoll** durchführen:

45°C für **10 min** (reverse Transkription)

95°C für **2 min**

40 Zyklen: (Amplifikation)

95°C für **0 sec**

50°C für **30 sec**

72°C für **20 sec**

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

NONE
SINGLE
NONE

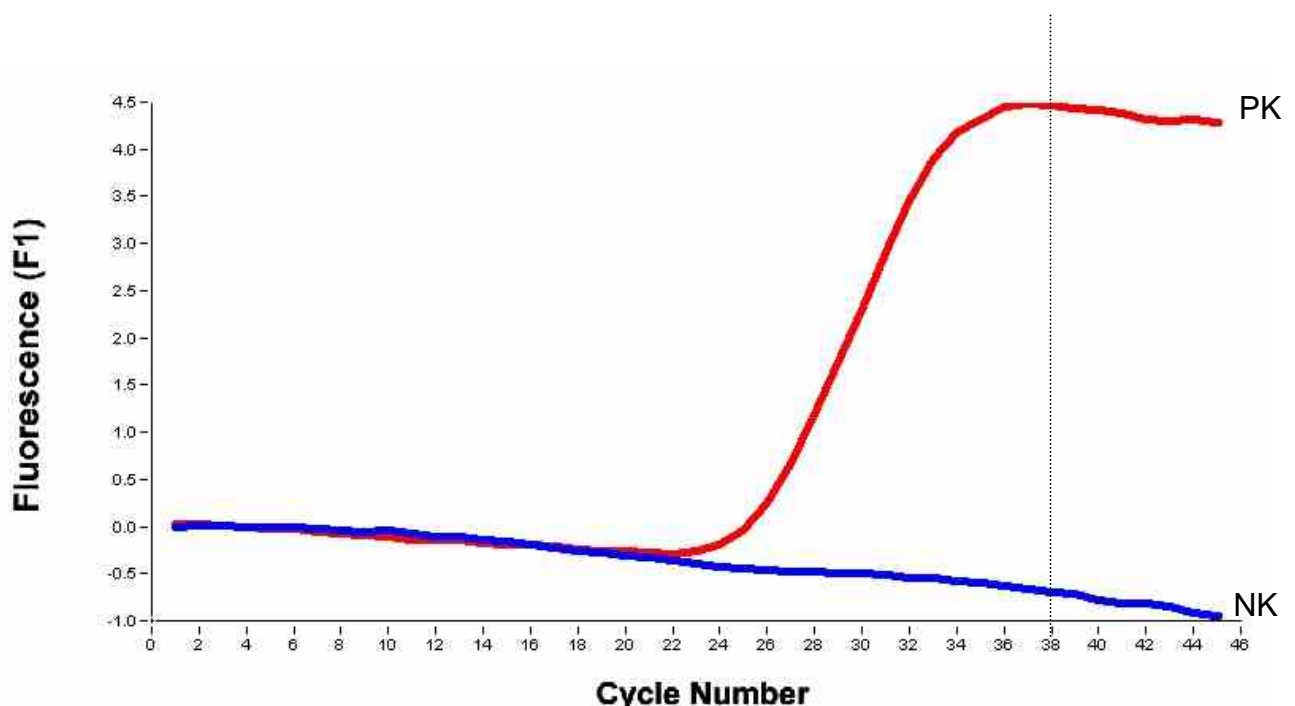
40°C für **30 sec**

C) RT-PCR ANALYSE UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

- 1) Durchführung der *real time* RT-PCR (z.B. LightCycler® - Kapillarsystem, Roche):
- 2) Schalten Sie den **Color Compensation** – Filter **ein**, welcher für die gleichzeitige Nutzung der verschiedenen Farbstoff-markierten Sonden benötigt wird (durch Aktivierung des Felds *Choose CCC File*).
- 3) Die Auswertung erfolgt **bis max. PCR-Zyklus 40** (s. Diagramm unten: Ende der log-phase der Positivkontrolle): das Ergebnis der Norovirus-spezifischen Amplifikation wird im 530 nm - Kanal (F1) angezeigt; das der internen Kontrolle im 705 nm - Kanal (F3 bzw. F6).

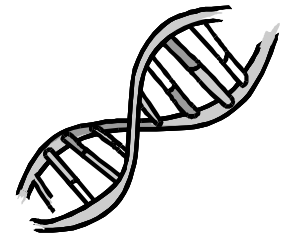
Folgende Resultate sind möglich:

- Bei 530 nm (F1) wird ein Signal detektiert.
Das Ergebnis ist positiv: **die Probe enthält Norovirus - RNA**.
In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im 705 nm - Kanal nicht notwendig, da hohe *Norovirus* cDNA - Konzentrationen zu einem verminderten bzw. fehlenden Fluoreszenz-Signal der internen Kontrolle im Kanal F3 führen kann (Kompetition).
- Bei 530 nm (F1) wird kein Signal detektiert, jedoch im 705 nm – Kanal F3 (Signal der internen Kontrolle).
Das Ergebnis ist negativ: **die Probe enthält keine Norovirus - RNA**.
Das detektierte Signal der internen Kontrolle schließt die Möglichkeit einer PCR-Inhibition aus.
- Weder bei 530 nm (F1) noch bei 705 nm (F3) wird ein Signal detektiert.
Es kann keine diagnostische Aussage gemacht werden.
Die *real time* RT-PCR - Reaktion wurde **inhibiert**.





MutaREAL[®] Norovirus

real time RT-PCR Kit



Qualitative assay for the specific detection of **Norovirus** (genogroup I and II) in *real time* PCR capillary systems (e. g. LightCycler[®], Roche^{*}).

REF KV2934124 
24

REF KV2934196 
96



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

For in vitro Diagnostic use only



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

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



1. INTENDED USE

The **MutaREAL[®] Norovirus** *real time* RT-PCR kit is a qualitative assay for the specific detection of Norovirus (genogroup I and II) in stool samples using *real time* PCR capillary systems (e.g. LightCycler[®], Roche) and **with license** from **Roche Molecular Systems, Inc.**.

2. INTRODUCTION

Gastroenteritis may be caused by a variety of enteric viruses. Even in industrialized countries gastrointestinal infections can cause life threatening diseases ultimately leading to death. It was recently shown, that the genetic heterogeneous group of **Noroviruses** (formally known as Norwalk-like viruses) are the major cause of non-bacterial gastroenteritis worldwide. The center of disease control (CDC, Atlanta, GA, USA) estimates that 23 billion cases of gastroenteritis/ year may be attributed to human caliciviridae (Mead et al. 1999). Thus, 66 % of all food- and water-borne infectious diseases are associated with Noroviruses. In contrast, only 30.2% of infection diseases are of bacterial origin (5.2 million) or 2.6% of parasite origin (Mead et al. 1999).

The reagents of the **MutaREAL[®] Norovirus** kit detect genera from high genetical diversity:

GI: *Norwalk, Southampton, Queens Arms, Desert Shield, Winchester, Sindlesham, Ciba*

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

Human Noroviruses are small, non-enveloped viruses with **ssRNA** (single stranded) genome. Noroviruses belong to the family of **Caliciviridae** and are divided into genotype I and II. These viruses are **resistant** against higher temperatures (60°C), acid (pH 3) and chlorit (10 mg/L). Due to their high **contagious** potential the viruses are transmitted **indirect** via contaminated food and water but also **direct** from person-to-person.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **MutaREAL[®] Norovirus** *real time* RT-PCR kit contains specific primers, Fluorescence-marked probes and additional material for the detection of the Norovirus I and II. Stool samples are used as starting material for the extraction of RNA and the subsequent analysis with **MutaREAL[®] Norovirus**.

The first step of the Norovirus detection is a **reverse transcription** (RT), during which the viral ssRNA is transcribed into cDNA. Afterwards, a thermostable DNA polymerase is used to amplify **Norovirus I** or **II** specific gene fragments by means of PCR (polymerase chain reaction). **Target sequence** for the detection is the region in the **ORF1 / ORF2 - junction**.

Furthermore, proof of specificity is achieved by hybridization of the amplicons with fluorescence marked hybridisation probes specific for genotype I or II.

Fluorescence is emitted and measured by the LightCycler[®]'s optical unit during the PCR process. The RT and PCR are done in one step. The detection of **specific Norovirus amplicates** fragment is performed at **530 nm** (fluorimeter channel F1).

Furthermore, by the use of an included **internal control** in each reaction, which is coamplified and detected, a possible inhibition of the **reverse transcription** (RT) or the **PCR** is determined. The detection of amplified internal control is performed at **705 nm** (fluorimeter channel F3 for 1.5 respectively F6 for 2.0).

4. KIT CONTENT

Each kit contains enough reagents to perform **24** respectively **96** tests. Each kit also contains a package insert.

Ref.	Reagent	Presentation 24	Presentation 96	Cap color
A1	Enzyme Mix	1 vial, 30 µl	1 vial, 90 µl	blue
A2	Primer-/ Probe Mix	1 vial, 400 µl	2 vials, 750 µl	yellow
A3	Positive Control	1 vial, 20 µl	1 vial, 50 µl	red
A4	Negative Control	1 vial, 200 µl	1 vial, 200 µl	green

5. TEST PERFORMANCE

Required materials - provided:

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

Required materials - not provided:

- *Real time* PCR capillary system (e. g. LightCycler® instrument, **Roche**)
- *Real time* PCR reaction tubes (e. g. LightCycler® capillaries, **Roche**)
- Table centrifuge (e. g. LightCycler® capillary centrifuge, **Roche**)
- Cryocontainer (e. g. LightCycler® cooling block, **Roche**)
- **Color Compensation Kit** for the used *real time* PCR system
- RNA extraction kit for stool samples (e. g. High Pure Viral RNA Kit, **Roche**)
- Pipets (0.5 µl – 200 µl)
- sterile filter tips for micro pipets
- sterile microtubes

6. STORAGE AND HANDLING

- All reagents (A1 to A4) should be **stored at <-20°C till immediate use** and then thawed **carefully** (at 8°C in refrigerator).
- **Avoid several freeze / thaw** cycles for the reagents A1, A2 and A3 (if necessary prepare suited aliquots and freeze again **immediately**).
- During preparation of PCR perform all working steps in a cryo-container (e.g. Light Cycler® Cooling block) or **cool all reagents** in suited manner.
- Primer-/ Probe-Mix (A2) should be **stored in the dark (light protection)**.
- All reagents can be used until the expiration date (printed on the labels).

7. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- **MutaREAL® Norovirus** is **licensed from Roche** – **no further taxes** (e. g. for „reported-results“) are necessary.
- This assay needs to be carried out by especially in molecular biology skilled personnel.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials.
- This assay needs to be run according to GLP (Good Laboratory Practice).
- Do not use the kit after its expiration date.

AMPLIFICATION

The PCR technology is utmost sensitive. Thus, amplification of a single molecule generates millions of identical copies. These copies may evade through aerosols and sit on surfaces.

In order to avoid contamination of samples with RNA/ DNA which previously was amplified, it is important to physically strictly divide sample and reagent preparation units from sample amplification units. Set up two separate working areas:

- 1) Isolation of the RNA/ DNA
- 2) Amplification/ detection of amplification products

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

- Use always sterile pipette tips with filters
- Wear separate coats and gloves in each area
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches with decontaminant
- Avoid aerosols

8. PROCEDURE

The complete procedure is separated in three steps:

- A) RNA extraction (stool).
- B) Reverse transcription of the RNA and following amplification and combined detection of cDNA templates using fluorescence-marked hybridisation probes in one step.
- C) Interpretation of the results using the software of the *real time* PCR capillary system.

A) RNA-EXTRACTION

- 1) RNA Extraction of viral RNA is done by use of a commercial available RNA isolation kit (e.g. High Pure Viral RNA kit, Roche) from stool samples according to the instructions of the manufacturer. As starting material use an appropriate aliquot of supernatant gained from a stool sample diluted with 1 ml of pure water (do not use any buffer) after the set-down of solid particles.
- 2) If the *real time* PCR is not performed immediately, the extracted RNA **must** be stored at **<-20°C** for storage.

B) *Real time* Norovirus RT-PCR-PROTOCOL

Please **read** careful the manufacturer's instructions **before** starting the procedure! The Master Mix volume for the respective number of samples and controls should be pipetted as follows:

- 1) The Enzyme Mix volume per reaction and sample (n) should be multiplied with the number of samples to be performed (including controls A3 and A4). For reasons of unprecise pipetting, add an extra (virtual) sample. Proceed in the same manner with all additional reagents!

Cool all reagents during the working steps!

Reaction Volume	Master Mix Volume
0.8 µl Enzyme Mix (A1)	0.8 µl x (n+1)
14.2 µl Primer-/ Probe Mix (A2)	14.2 µl x (n+1)

- 2) Mix gently (Enzyme Mix, A1 and Primer-/ Probe Mix, A2) in a sterile microtube **by pipetting several times** (about **15 – 20 x**, **do NOT vortex !**): This mixture is the Master Mix - spin down briefly in a table centrifuge for collection of the solution at the bottom of the tube.
- 3) Pipet **15 µl** of Master Mix using micropipets with sterile filter tips in each of the *real time* PCR reaction tubes (e. g. LightCycler[®] capillaries).

Add **5 µl** of the RNA sample or positive and negative controls (A3 and A4) to each of the corresponding PCR reaction tubes (it is recommended to lock the capillaries of the samples immediately after filling and to pipet the negative control first but to close last [as contamination control]).

- 4) Spin down briefly to collect reagents at the bottom of PCR reaction tubes (for capillaries use LightCycler[®] capillary centrifuge).
- 5) Perform the following **real time RT-PCR** protocol:

45°C for **10 min** (reverse transcription)

95°C for **2 min**

40 cycles: (amplification)

95°C for **0 sec**

50°C for **30 sec**

72°C for **20 sec**

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

NONE

NONE

40°C for **30 sec**

C) PCR ANALYSIS AND INTERPRETATION OF RESULTS

- 1) Perform the *real time* RT-PCR (e. g. in the LightCycler[®] capillary system, **Roche**).
- 2) Switch **on** the **color compensation** filter (required because of the simultaneous use of several fluorescence-marked probes) by activating the field *Choose CCC File*.
- 3) Result interpretation is done till **maximum PCR cycle 40** (see diagram below: end of the log-phase from the positive control): the result of the **specific Norovirus amplification** is shown **at 530 nm** (channel F1), the internal control is shown at 705 nm (channel F3 respectively F6).

Following results can arise:

- A signal is detected at 530 nm (F1).
The result is positive: **The sample contains Norovirus RNA.**
In this case, the detection of a signal at 705 nm is inessential, as high concentrations of *Norovirus* cDNA can lead to a reduced or absent fluorescence signal of the internal control in channel F3 (competition).
- No signal is detected at 530 nm (F1), but only at 705 nm (F3, signal of the internal control).
The sample does not contain any Norovirus RNA.
The detected signal of the internal control excludes the possibility of an inhibition.
- Neither at 530 nm (F1) nor at 705 (F3) nm is a signal detected.
A diagnostic statement can not be made.
Inhibition of the *real time* RT-PCR reaction.

