



**PCRFast[®]
Norovirus**

**Realtime (Sonde)
Realtime (probe)**

IF/MR1022

Deutsch Seite 2
English Page 13

Kurzinformation

Einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum qualitativen Nachweis von Norovirus in Realtime (Fam Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) in Lebensmitteln (Nachweis von Genotyp I und Genotyp II). Mit dem Test können 96 Reaktionen durchgeführt werden. Alle Reaktionsgefäße enthalten jeweils spezifische Primerpaare und Sonden für die Analyse von Proben und Negativkontrollen (NTC) sowie eine Reverse Transkriptionskontrolle (RTC, HEX Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) zur Überprüfung der Reversen Transkriptase und möglicher inhibitorischer Effekte.

8 Reaktionsgefäße (rote Markierung) enthalten zusätzlich Norovirus - cDNA für die Positivkontrolle (PTC).

Zeitbedarf:	RNA - Extraktion.....	45 min
(10 Proben)	PCR-Ansatz.....	15 min
	PCR.....	2 h

PCRFast®

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH. ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast®

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH. ifp also offers contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Testprinzip

PCRFast[®] Norovirus ist ein einfach durchzuführender molekularbiologischer Test (PCR) zum Nachweis von Norovirus (Genotyp I und Genotyp II) in Lebensmitteln. Die Vorgabe zur Durchführung entspricht den internationalen Standards (z.B. ISO/DIS 20838) für die PCR Analytik sowie den offiziellen Vorschriften nach § 64 LFGB.

Alle Reaktionsgefäße enthalten die für die PCR - Reaktion notwendigen spezifischen Primer und Sonden in optimaler Menge und eine **Reverse Transkriptionskontrolle (RTC)** mit MS2 Phagen spezifische Primer und Sonde (HEX-Sonde mit nicht fluoreszierendem Quencher) sowie zusätzlich MS2 Phagen - RNA zur Überprüfung der reversen Transkription und möglicher inhibitorischer Effekte.

Die **88 nicht markierten Reaktionsgefäße (farblos)** enthalten spezifische Primer und Sonden (Fam Sonde mit nichtfluoreszierendem Quencher) für den Nachweis von **Norovirus - RNA mittels reverser Transkription und anschließender Amplifikation der gebildeten Norovirus - cDNA in der extrahierten Probe** und für die **Negativkontrollen NTC** (Überprüfung des MasterMixes auf Kontamination).

Die **8 markierten Reaktionsgefäße (rot)** enthalten neben den Primern und Sonden zusätzlich Norovirus - cDNA. Diese werden für die **Positivkontrollen PTC** (Überprüfung der Funktionalität des MasterMixes) verwendet.

In das Reaktionsgefäß wird **12,75 µl zweifach konzentrierter MasterMix** (12.5 µl 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix und 0.25 µl QuantiTect RT Mix) vorgelegt und anschließend **12,25 µl des RNA - Extraktes** zugegeben. Der MasterMix enthält bereits Polymerase, Transkriptase, Nukleotide und Magnesiumchlorid in optimaler Konzentration. Die Zielsequenz wird dann in einem PCR - Thermocycler revers transkribiert und amplifiziert. Bei korrekter Amplikonsequenz hybridisiert die Sonde auf den vervielfältigten DNA-Abschnitten. Dabei werden Reporter (Fam/HEX) und Quencher (nicht fluoreszierend) der Sonde getrennt und der Reporter (Fam/HEX) sendet ein Fluoreszenzsignal (Fam:520 nm, HEX:553 nm) aus. Die Intensität dieses Signals steigt mit der Menge an neu gebildeter DNA an, wodurch sich bei vorhandener Zielsequenz ein Anstieg der Fluoreszenz messen und darstellen läßt. Bei nicht vorhandener Zielsequenz ist kein Fluoreszenzanstieg beobachtbar.

Anmerkung:

RNA Lösungen reagieren sehr empfindlich auf geringste Spuren an Ribonukleasen. Zügiges Arbeiten und die Vermeidung von Standzeiten RNA-haltiger Lösungen (RNA-Extrakte, PCR-Ansatz,...) sind entscheidend für den sensitiven Nachweis von Noroviren. Um längere Standzeiten zu vermeiden besteht die Möglichkeit die Aktivität der Ribonukleasen durch einfrieren des PCR-Ansatzes vor der Amplifikation bei mindestens - 20°C zu minimieren.

2. Packungsinhalt

Der Testkit enthält:

- 11 x **Streifen (farblos)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (88 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern und Sonden (für die Probenbestimmungen und Negativkontrollen, NTC) sowie einer Reversen Transkriptionskontrolle (RTC, zur Überprüfung der reversen Transkription und möglicher inhibitorischer Effekte)
- 1 x **Streifen (rot)** mit je 8 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen (8 Reaktionsgefäße), beschichtet mit spezifischen Primern, Sonden und Norovirus - cDNA (für die Positivkontrollen, PTC) sowie einer Reversen Transkriptionskontrolle (RTC, zur Überprüfung der reversen Transkription und möglicher inhibitorischer Effekte)

3. Zusätzlich benötigte Reagenzien und Geräte

Geräte und Labormaterialien

- Vortexer
- Biozentrifuge, mind. 14.000 x g (für 2,0 ml Reaktionsgefäße)
- PCR – Thermocycler Realtime:**
 - z.B. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- Mikroliterpipetten 2 - 20 µl; 20 - 200 µl; 100 - 1000 µl, z. B. Gilson Pipetman P, jeweils mit Filterspitzen
- 1,5 ml oder 2,0 ml Reaktionsgefäße
- Wattetupfer, vorzugsweise mit Kunststoffstiel

Reagenzien

- Ethanol >95 % (vergällt)
- 0,1 x TE - Puffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0,1 mmol / l)
- Wasser deionisiert, DNA – frei
- RNA-Extraktionskit, z.B. Qiagen „QIAamp[®] Viral RNA Kit

PCR

Realtime

zweifach konzentrierter MasterMix (reverse Transkription und PCR)
z.B. QuantiTect™ Probe RT-PCR Kit, Qiagen, Nr.: 204443; Brilliant® II
QRT-PCR MasterMix Kit, Stratagene, Nr.:600809

4. Vorsichtsmaßnahmen

- alle Arbeiten sollten mit den im Labor üblichen Schutzmassnahmen und alle PCR Arbeiten entsprechend den Empfehlungen nach CEN / ISO durchgeführt werden
- zur Vermeidung von Verschleppungen alle Arbeiten mit Schutzhandschuhen und Filterspitzen durchführen
- räumliche Trennung von Probenaufarbeitung, PCR - Setup und Detektion beachten

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Den Testkit bzw. die Reaktionsgefäße bei 2 - 8 °C lagern.

6. RNA - Isolierung

Die Extraktion von Lebensmittelproben erfolgt nach den Vorschriften des § 64 LFGB (L00.00 - 112).

Noroviren werden mit einem sterilen, angefeuchteten (z.B. mit PBS) Tupfer von der zu untersuchenden Oberfläche abgestrichen. Die Viren werden von dem Tupfer direkt in den Lysepuffer (in kommerziellen RNA - Testkits enthalten) überführt (siehe L00.00 - 112). Für die weitere RNA - Extraktion aus Lebensmitteln die Herstelleranweisung der RNA - Extraktionskits befolgen (z.B. Qiagen „QIAamp® Viral RNA Kit).

Bei jeder Analysenserie sollte ein Ansatz ohne Matrixzugabe als Extraktionskontrolle mitgeführt werden. Eine positive Extraktionskontrolle zeigt eine Kontamination der Reagenzien an.

7. PCR - Ansatz

7.1. Vorbereitungen

- Streifen aus der Folie entnehmen und benötigte Anzahl Reaktionsgefäße abtrennen
- die restlichen Streifen / Reaktionsgefäße zusammen mit dem Trockenbeutel in die Folie zurücklegen, Folie gut verschließen und bei 2 - 8 °C lagern
- die benötigte Menge MasterMix bereitstellen (pro Reaktion 12,75 µl)

7.2. Ansatz

- folgende Volumina in die Reaktionsgefäße pipettieren:

Pro Probe	Reaktionsgefäß	Master-Mix	Probe
Probe	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Pro Ansatz	Reaktionsgefäß	Master-Mix	0,1 x TE - Puffer
Negativ-kontrolle NTC	farblos	12,5 µl	12,5 µl
Positiv-kontrolle PTC	rot	12,5 µl	12,5 µl

Tab. 1: Pipettieransatz PCRFast® Norovirus

- die Reaktionsgefäße verschließen (abzentrifugieren empfohlen) und in den PCR - Thermocycler stellen.

7.4. Geräteeinstellungen

Reporter: Fam und HEX
Quencher: keine Fluoreszenz
Referenzfarbstoff: ROX (QuantiTect™ Probe RT – PCR)

Anmerkung:

Der MasterMix QuantiTect™ Probe RT-PCR von Qiagen besitzt eine hohe ROX-Konzentration. Bei Realtime Thermocyclern die Rox direkt anregen können führt dies zu sehr niedrigen dRn-Werten.

Für die Amplifikation folgendes Temperatur - / Cyclerprofil einstellen:

–Cyclerprofil

30 min	50 °C	reverse Transkription
15 min	95 °C	Aktivierung der Taq Polymerase
15 sec	95 °C	
60 sec	60 °C	45 Zyklen

Anmerkung:

Die Validierung wurde mit QuantiTect™ Probe RT-PCR Master Mix von Qiagen und den unter Punkt 3 genannten Thermocyclern durchgeführt. Eventuell muss das vorgegebene Cyclerprofil an das jeweilige Gerät und den MasterMix angepasst werden.

7.5. Detektion

- die Auswertung der Amplifikation erfolgt über den Amplificationplot
- prinzipiell soll die Auswertung über die Software der Realtime Thermocycler erfolgen. Ergeben die Voreinstellungen der Analysesoftware keine zufriedenstellenden Ergebnisse, lassen sich die Einstellungen für den „Threshold“ und die „Basislinie“ ändern.

8. Auswertung

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung zusammengefasst. Bei einer positiven Probe liegt der Fluoreszenzenwert der Amplifikationskurve deutlich über dem Threshold.

8.1. Auswertematrix

Probe	Reverse Trans- kriptionskontrolle RTC	Ergebnis
keine Amplifizierung	Amplifizierung	Probe negativ
Amplifizierung	Amplifizierung	Probe positiv
keine Amplifizierung	keine Amplifizierung	Inhibition *

Negativkontrolle NTC	Positiv- kontrolle PTC	Ergebnis
keine Amplifizierung		MasterMix nicht kontaminiert
	Amplifizierung	MasterMix funktionsfähig

* extrahierte Proben - RNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren
 Tab. 2: Auswertung PCRFast® Norovirus

8.2. Beispiele für die Auswertung der Amplifikationplots

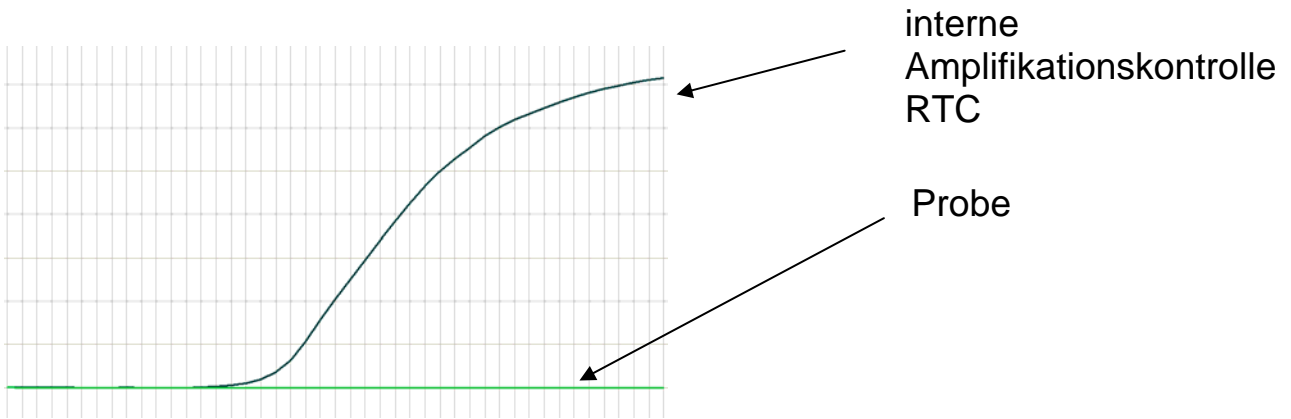


Abb. 1: Probe ist negativ (keine Amplifizierung der Probe)

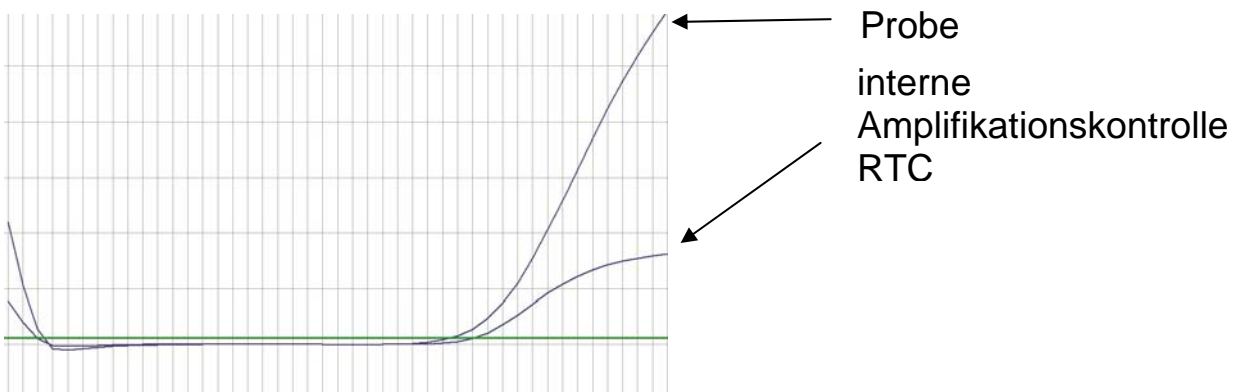


Abb. 2: Probe ist positiv

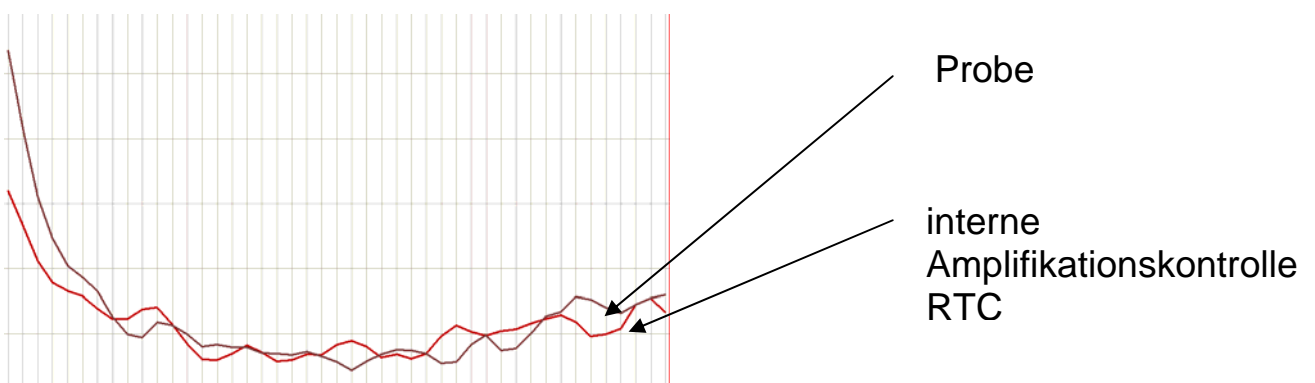


Abb. 3: Inhibition der Reaktion, isolierte DNA nochmals verdünnen und erneut amplifizieren

9. Sensitivität

Die Nachweisgrenze des Systems liegt bei < 20 Kopien pro Reaktionsansatz. Bezogen auf Norovirus in Lebensmittel ist die Nachweisgrenze abhängig von der Extraktionsmethode und der Effizienz der reversen Transkription.

10. Spezifität

PCRFast[®] Norovirus ist spezifisch auf Norovirus Genotyp I und Genotyp II. Folgende Spezies wurden mit mind. 2500 Kopien pro Reaktionsansatz auf Kreuzreaktivität getestet:

Spezies		Spezies		Spezies	
Norovirus GG1	+	Norovirus GG2	+	Escherichia coli	-
Yersinia enterocolitica	-	Legionella pneumophilia	-	Campylobacter jejuni	-
Staphylococcus aureus	-	Bacillus cereus	-	Salmonellen	-
Clostridium perfringens	-	VTEC stx1	-	VTEC stx2	-
Legionella erythra	-	Shigella flexneri	-	Listeria monocytogenes	-
Clostridium difficile	-	Legionella pneumophilia	-	Helicobacter pylori	-

Tab. 3: Spezifität PCRFast[®] Norovirus

- + Amplifikation
- keine Amplifikation

Sollten Fragen zur Durchführung des Testes, zur Probenaufarbeitung oder zur PCR - Analytik im Allgemeinen bestehen, dann wenden Sie sich bitte an das Kompetenzzentrum für DNA - Analytik des ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50



Weitere Informationen zur Durchführung von PCRFast[®] finden Sie auch unter www.produktqualitaet.com.

Diese Angaben entsprechen dem heutigen Stand unserer Kenntnisse und sollen über unsere Produkte und deren Anwendungsmöglichkeiten informieren. Sie haben somit nicht die Bedeutung, bestimmte Eigenschaften der Produkte oder deren Eignung für einen konkreten Einsatzzweck zuzusichern. ifp übernimmt keine Gewährleistung, außer für die standardisierte Qualität der Reagenzien. Defekte Produkte werden ersetzt. Darüber hinaus gehende Ansprüche für direkte oder indirekte Schäden oder Kosten aus der Nutzung der Produkte entstehen nicht.

11. Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

L 00.00 - 112 „Qualitativer Nachweis von Noroviren der Genogruppe I und II auf glatten, festen Oberflächen von Lebensmitteln durch realtime RT - PCR“

Dreier J., Störmer M., Mäde D., Burkhardt S., Kleesiek K. “Enhanced Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Norovirus Genogroup I” J Clin Microbiol (2006), **44 (8)**, 2714 – 2720.

Hoehne M., Schreier E. “Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe” BMC Infectious Diseases (2006), **6 (69)**.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 22174)

L 00.00 - 45 „Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20837)

L 00.00 - 109 „Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase - Kettenreaktion (PCR)“

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (entspricht ISO 20838)

L 00.00 - 110 „Anforderung an die Amplifikation und den Nachweis bei qualitativen Verfahren zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mit der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)“

PCRFast[®] Norovirus Realtime (probe)

Brief information

Simple, molecular biological test (PCR) for the qualitative detection of norovirus in realtime (probe with Fam reporter and non fluorescence quencher) in foodstuffs (detection of the genotype I and genotype II). The test kit has 96 reaction vials. Each reaction vial contain specific primer pairs and probes for the analysis of samples and negative controls (NTC). Additionally every reaction tube contains a reverse transcription control (RTC, probe with HEX reporter and non fluorescence quencher) for testing the reverse transcription and investigating possible inhibition effects.

8 reaction vials (red marking) contain additionally norovirus - cDNA for the positive controls (PTC).

Time required:	RNA - Extraction.....	45 min
(10 samples)	PCR setup.....	15 min
	PCR.....	2.0 h

PCRFast[®]

ist ein eingetragenes Warenzeichen der ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp führt auch Auftragsanalytik durch.

Hersteller: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

PCRFast[®]

is a registered trademark of the ifp Institut für Produktqualität GmbH.
ifp also offers contract analysis.

Manufacturer: ifp Institut für Produktqualität GmbH
Teltowkanalstr. 2, 12247 Berlin, Germany
www.produktqualitaet.com

1. Principle of the test

PCRFast[®] Norovirus is a simple, molecular biological test (PCR) for the qualitative detection of norovirus (genotype I and genotype II) in food. The analytical procedure described here complies with the international standards (e.g. ISO/DIS 20838) for PCR analysis.

All the reaction vials contain the optimum amount of the specific primers and probes required for the PCR reaction and a **reverse transcription control (RTC)** consisting of MS2 phage specific primers and probe (HEX labelled probe with non fluorescence quencher) as well as MS2 phage RNA for checking the reverse transcription and inhibition control.

The **88 colourless reaction vials (coulerless)** contain specific primer pairs and probes (FAM labelled with non fluorescence quencher) used for detecting **norovirus RNA by reverse transcription and subsequent amplification of the norovirus cDNA** in the extracted sample and for the **negative controls NTC** (checking the MasterMix for contamination).

The **8 red marked reaction vials** contain **norovirus- cDNA** as well as the specific primers and probes (Fam labelled with non fluorescence quencher). These are used for the **positive controls PTC** (checking the functionality of MasterMix).

Place **12.75 µl of MasterMix** into the reaction vial (12.5 µl 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix and 0.25 µl QuantiTect RT Mix per reaction) and add **12.25 µl of the RNA sample extract**. The MasterMix already contains polymerase, transcriptase, nucleotides and magnesium chloride in optimum concentrations. The target will be transcribed and amplified in the PCR thermocycler. Is the target present the probe hybridises on the synthesised DNA fragments. Thereby the reporter (Fam / HEX) and the quencher (non fluorescence) of the probe will be separated and the reporter radiates a fluorescence signal (Fam: 520 nm / HEX: 553 nm). The intensity of the signal increases with the amount of synthesised DNA which can be measured and displayed. If the target sequence is not present no increase in the fluorescence is detectable.

Note:

RNA solutions are very highly sensitive to ribonucleases. Concentrated working and the avoiding of standing times of RNA-solutions (RNA extracts, PCR-setup;...) are crucial for a sensitive detection of Norovirus. To avoid longer standing times it is possible to minimize the ribonuklease activity by freezing the PCR – setup before the amplification at no less than – 20°C (- 4 °F).

2. Package contents

The test kit contains:

- 11 x **strips (colourless)** with 8 x 0.2 ml reaction vials each (88 reaction vials), coated with specific primers and probes (for sample determinations and for the negative controls, NTC) and containing a reverse transcription control (RTC, checking the reverse transcription and inhibition effects).
- 1 x **strips (red)** with 8 x 0.2 ml reaction vials each (8 reaction vials), coated with specific primers, probes and additionally Norovirus - cDNA (for the positive controls PTC) and containing a reverse transcription control (RTC; checking the reverse transcription and inhibition effects).

3. Additionally required instruments and reagents

Lab material and instruments

- vortexer
- biocentrifuge, min. 14,000 x g (for 1.5 ml and 2.0 ml reaction vials)
- PCR thermocycler:**
 - e.g. Applied Biosystems 7500, STRATAGENE Mx 3005 P, Mx 3000 P
- microliter pipettes 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1,000 µl, e.g. Gilson Pipetman P with filter tips
- 1.5 ml or 2.0 ml reaction vials
- gauze swab, plastic shaft recommended

Reagents

- ethanol >95 % (denatured)
- 0.1 x TE - buffer (TRIS 1 mmol / l, EDTA 0.1 mmol / l)
- water deionised, DNA free
- DNA-extraction kit, e.g. Qiagen „QIAamp[®] Viral RNA Kit

PCR

Realtime

- double concentrated MasterMix (reverse transcription and PCR)
QuantiTect™ Probe RT - PCR Kit, Qiagen, No.: 204443, Brilliant® II
QRT-PCR MasterMix Kit, Stratagene, No.:600809

4. Precautions

- all tasks should be performed taking all precautions common in labs, and all PCR tasks should be performed in accordance with the CEN / ISO recommendations
- to avoid carryovers, perform all work wearing protective gloves and use filter tips
- perform sample preparation, PCR setup and detection in separate rooms

5. Storage instructions

Store the test kit and the reaction vials at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F).

6. RNA Isolation

Food samples are extracted according to § 64 of the German Foodstuffs and Animal Feed Code (LFGB, L00.00 - 112).

Drop off the norovirus with a steril, moistened (e.g. PBS) swab from the food material. Transfer the viruses directly in the Lysesbuffer (in commercial RNA – Extraction kits included, see L00.00 - 112). Proceed in comply with manufacturer description (e.g. Qiagen “Qiamp® Viral RNA Kit”)

With each analyzing series one sample without matrix should be done as an extraction control. A positive extraction control indicates a contamination in the reagents.

7. PCR setup

7.1. Preparations

- remove strip from the plastic bag and separate required number of reaction vials
- place the remaining strips / reaction vials and the desiccant back into the bag, seal bag and store at 2 - 8 °C (35.6 - 46.4 °F)
- have the required amount of MasterMix at hand (12.75 µl per reaction)

7.2. Procedure

–pipette the following volumes into the reaction vials:

	reaction vial	Master-Mix	extracted sample RNA
sample	colourless	12.75 µl	12.25 µl
for each analysis run	reaction vial	Master-Mix	water deionized
negative control NTC	colourless	12.75 µl	12.25 µl
positive control PTC	red	12.75 µl	12.25 µl

Tab. 1: PCRFast[®] Norovirus pipetting steps

–close the reaction vials (centrifuging recommended) and place them into the PCR Thermocycler

7.4. Instrument settings

Reporter: Fam and HEX
Quencher: non fluorescence
Reference dye: ROX (QuantiTect[™] Probe RT-PCR)

Note:

The QuantiTect[™] Probe RT-PCR master mix from Qiagen contains a high ROX level. Using realtime thermocycler which are able to excite ROX directly this results in extremely low dRn –values.

Perform amplification according to the following temperature / cycler profile:

Cycler profile

30 min	50 °C (122 °F)	reverse transcription
15 min	95 °C (203 °F)	activation of Taq polymerase
15 sec	95 °C (203 °F)	
60 sec	60 °C (140 °F)	45 cycles

Note:

Validation was performed using QuantiTect™ Probe RT-PCR MasterMix from Qiagen and the thermocycler specified in section 3. The specified cycler profile may need to be adjusted to the respective instrument and the MasterMix.

7.5. Detection

- assessment of the amplification in realtime is done via the amplification plot
- in principle the evaluation should be done using the software of the realtime thermocycler. Are the results not satisfactory using the instrument presettings, the “threshold” and the “baseline” settings could be change

8. Evaluation

The following table summarizes the evaluation. With a positive sample the final point of the fluorescence curve lies clearly above the threshold

8.1. Evaluation matrix

sample	reverse transcription control RTC	result
no amplification	amplification	sample negative
amplification	amplification	sample positive
no amplification	no amplification	inhibition *

negative control NTC	positive control PTC	result
no amplification		no contamination of master mix
	amplification	master mix is functional

* dilute extracted sample RNA once more and amplify again

Tab. 2: Evaluation of PCRFast® Norovirus

8.2.2. Examples of amplification plot evaluation

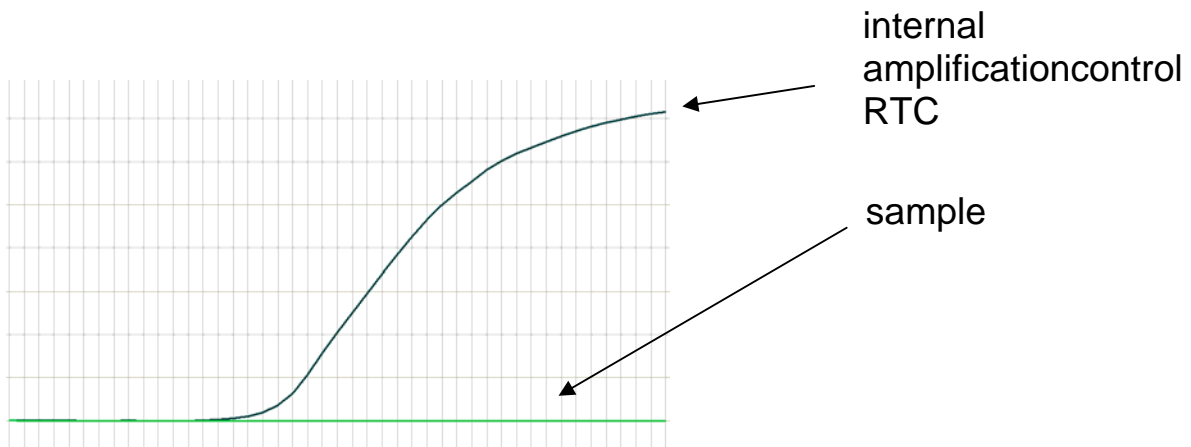


Fig. 1: sample negative; sample without amplification plot

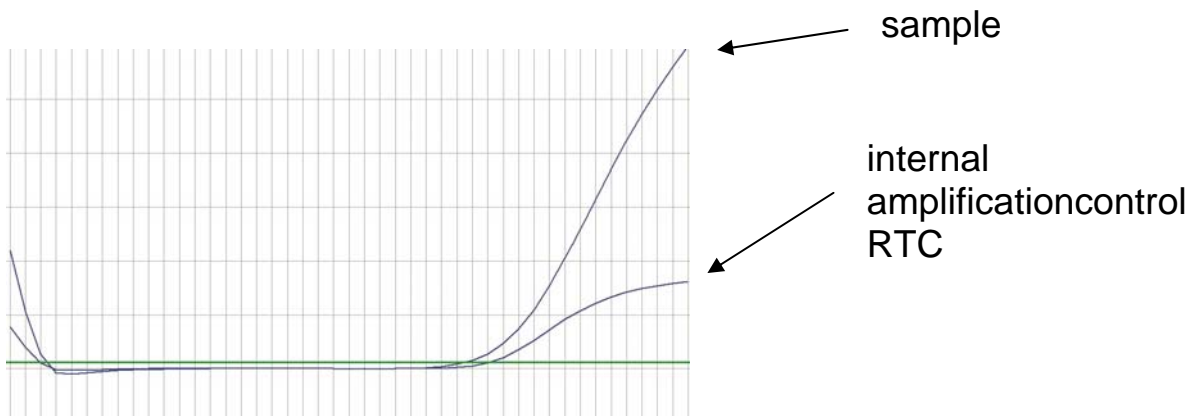


Fig. 2: sample positive

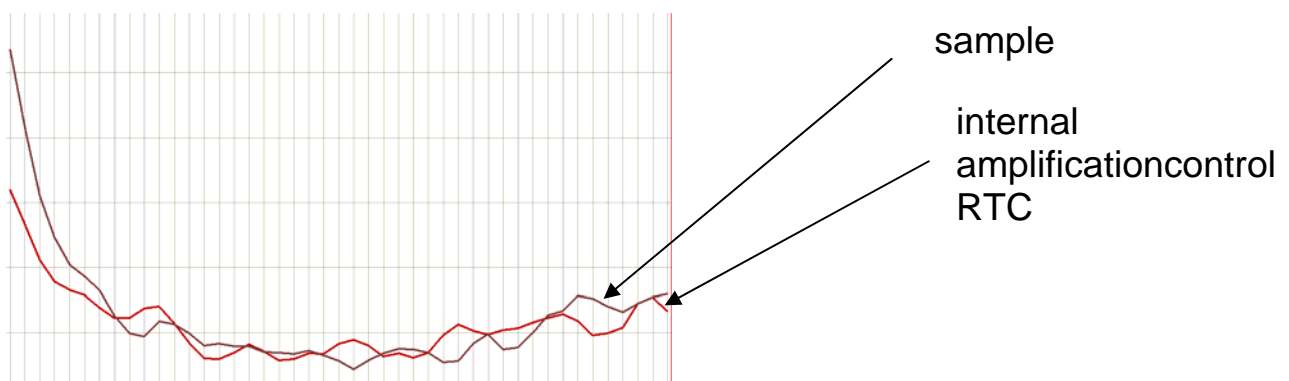


Fig. 3: reaction inhibition, further diluting the isolated DNA

9. Sensitivity

The limit of detection is < 20 copies per reaction. Regarding norovirus in food the limit of detection is depending on the extraction method and efficiency of the reverse transcription.

10. Specificity

PCRFast[®] Norovirus is specific for norovirus genotype I and genotype II. The following species have been tested for cross - reactivity with at least 2500 copies each:

species		species		species	
Norovirus GG1	+	Norovirus GG2	+	Escherichia coli	-
Yersinia enterocolitica	-	Legionella pneumophilia	-	Campylobacter jejuni	-
Staphylococcus aureus	-	Bacillus cereus	-	Salmonellen	-
Clostridium perfringens	-	VTEC stx1	-	VTEC stx2	-
Legionella erythra	-	Shigella flexneri	-	Listeria monocytogenes	-
Clostridium difficile	-	Legionella pneumophilia	-	Helicobacter pylori	-

Tab. 3: Specificity of PCRFast[®] Norovirus

+ amplification

- no amplification

Should you have any questions on how to conduct this test, on sample preparations or on PCR analysis in general, please contact the Competence Centre for DNA Analysis of ifp, Institut für Produktqualität.

info@produktqualitaet.com

Tel. 0049 (0) 30 76 68 60 - 0

Fax 0049 (0) 30 76 68 60 - 50



You will also find more information on conducting PCRFast[®] at www.produktqualitaet.com.

These specifications are based on our current state of knowledge and are designed to provide information about our products and their potential applications. They are not intended to guarantee certain product properties or suitability for a specific application. ifp does not accept any liability except for the standard quality of the reagents. Replacement will be provided for any defective products. ifp is not liable for any other claims concerning direct or indirect damage or costs arising from the use of the products.

11. Literatur

Official collection of analysis methods after §64 LFGB

L 00.00 – 112 „Method for qualitative detection of Norovirus onto firm and smooth surfaces from food by Real-time PCR“

Dreier J., Störmer M., Mäde D., Burkhardt S., Kleesiek K. “Enhanced Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Norovirus Genogroup I” J Clin Microbiol (2006), **44 (8)**, 2714 - 2720.

Hoehne M., Schreier E. “Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe” BMC Infectious Diseases (2006), **6 (69)**.
Microbiol., 73 (15), 2007, S. 4769-4775

ISO 22174

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - General requirements and definitions

ISO 20837

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for sample preparation and qualitative detection

ISO 20838

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food - borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods