



RIDA[®]GENE Sapovirus

REF PG1605



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



Deutsch	3
English.....	19
Español.....	35
Français.....	51
Italiano	67
Português	83

RIDA®GENE Sapovirus

REF PG1605

1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. RIDA®GENE Sapovirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Sapovirus aus humanen Stuhlproben.¹

Die RIDA®GENE Sapovirus real-time RT-PCR soll die Diagnose einer durch Sapovirus verursachten Gastroenteritis unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Sapoviren, auch Saporovirus genannt, gehören zur Familie der *Caliciviridae* und werden als Sapporo-like Viren klassifiziert.² Zusammen mit den Norwalk-like Viren (Norovirus) sind sie weltweit die häufigsten Erreger einer Gastroenteritis. Der Name Sapovirus hat seinen Ursprung durch die Stadt Sapporo in Japan, in der das Sapovirus 1977 zum ersten Mal in einem Kinder-Waisenhaus entdeckt wurde. Auch wenn das höchste Auftreten von Sapovirusinfektionen in Kindern unter fünf Jahren beschrieben ist, gibt es auch Sapovirusausbrüche in Erwachsenen.³ Klinische Symptome einer Infektion ähneln mit Diarrhoe, Erbrechen und Fieber zwar denen einer Norovirusinfektion, jedoch führt eine Sapovirusinfektion zu einer wesentlich milderden Form der Gastroenteritis.

Seit seiner ersten Entdeckung in Japan, gab es weitere Ausbrüche weltweit in Ländern wie den USA, Kanada, Afrika und Südafrika.^{4,5,6} Es sind mindestens fünf Genogruppen (GGI – GGV) beschrieben, wobei GGI, GGII, GGIV und GGV Menschen infizieren können. Bis heute gibt es wenige epidemiologische Studien und Sapoviren wurden aufgrund von wenig sensitiven Methoden selten diagnostiziert. Daher stellt die real-time RT-PCR einen erheblichen Vorteil dar, um Gastroenteritis-verursachende Sapovirusinfektionen nachzuweisen.

3. Testprinzip

RIDA®GENE Sapovirus ist eine multiplex real-time RT-PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Sapovirus RNA. Der Nachweis erfolgt im One-Step real-time RT-PCR Format, d.h. die reverse Transkription (RT) und die anschließende PCR finden in einem Reaktionsgefäß statt. Die isolierte RNA wird dabei mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die für Sapovirus spezifischen Genfragmente werden anschließend mittels real-time RT-PCR amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen (ORF1-Gen) werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die **Taq-Polymerase** den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE Sapovirus Test enthält eine **Internal Control RNA** (ICR), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR Inhibition kontrollieren zu können.

4. Packungsinhalt

Tab. 1: Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x 1050 µl	gelb
2	Enzyme Mix	1x 80 µl	rot
R	Internal Control RNA	2x 1700 µl	braun
N	No Template Control	1x 450 µl	weiß
P	Positive Control	1x 200 µl	blau

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE Sapovirus real-time RT-PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden Extraktionsplattformen und real-time PCR-Geräten:

Tab.2: Validiertes Zubehör

Extraktionsplattformen	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Hinweis: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäß verwenden

Sollten Sie weitere Extraktionsverfahren oder real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) bei Verwendung des LightCycler® 480II und des LightCycler® 480 z
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäß, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäß oder Platten
- Vortexer
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei)

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

- Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter www.r-biopharm.com.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 RNA-Präparation aus Stuhlproben

Für die RNA-Isolierung aus Stuhlproben wird ein kommerziell erhältliches RNA-Extraktionskit (z.B. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) oder RNA-Extraktionsystem (z.B. Maxwell® RSC (Promega)) für Stuhlproben empfohlen. Die Angaben des Herstellers sind zu beachten.

Es wird empfohlen die Stuhlproben vor der Extraktion 1:10 mit PCR-Wasser zu verdünnen, stark zu vortexen und 1 min bei 13.000 x g zu zentrifugieren. Aus dem Überstand das entsprechende Volumen nach Angaben des Herstellers verwenden.

Der RIDA®GENE Sapovirus Test enthält eine **Internal Control RNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control RNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control RNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control RNA** dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die Internal Control RNA als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der Internal Control RNA während der Extraktion eingesetzt werden. Die Internal Control RNA soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl der Internal Control RNA zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

9. Testdurchführung

9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab.3, Tab.4). Vor der Benutzung den Reaction Mix, den Enzyme Mix die Positive Control, die No Template Control und die Internal Control RNA auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

Tab. 3: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

Tab. 4: Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICR nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren

9.2 Herstellung des RT-PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäß(e/Gefäße/Platten) pipettieren.

Negativkontrolle: Je 5 µl **No Template Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control RNA** zum RT-PCR Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

Proben: Je 5 µl RNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

Hinweis: Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control RNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle je 1 µl der **Internal Control RNA** zum RT-PCR Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäß(e bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die RT-PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.5, Tab.6).

9.3 Geräteeinstellungen

9.3.1 Universal real-time RT-PCR Profil

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR Profil für LightCycler® Serie

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q und CFX96™

<u>Reverse Transkription</u>	10 min, 58 °C
Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Hinweis: Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

Hinweis: Das Universal real-time PCR Profil kann auch für DNA Tests verwendet werden, wenn RIDA®GENE DNA und RIDA®GENE RNA real-time PCR Tests in einem Lauf kombiniert werden.

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 7: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions-kanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	Sapovirus	530	RIDA®GENE Color Compensation II (PG0002) wird benötigt
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation IV (PG0004) wird benötigt
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovirus	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovirus	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICR	Yellow	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovirus	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovirus	FAM	-
	ICR	VIC	

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb. 1).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μl vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 8: Ein valider PCR-Lauff muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICR Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * ¹	Siehe Quality Assurance Certificate
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	0

*¹ Ein Ct-Wert für die ICR ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle in dem angegebenen Ct-Bereich nicht positiv ist, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu überprüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung

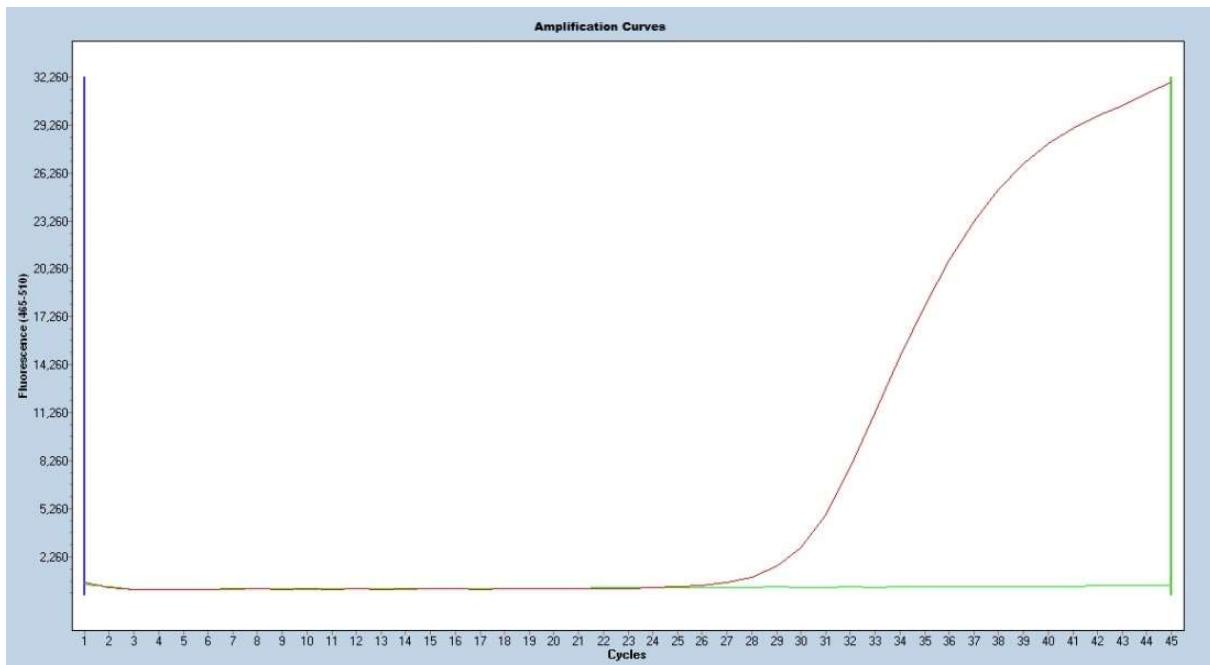


Abb.1: Korrekter Verlauf der Positivkontrolle und Negativkontrolle (Sapovirus) auf dem LightCycler® 480II

11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

Tab. 9: Interpretation der Ergebnisse

Sapovirus	ICR	Ergebnis
positiv	positiv/negativ	Sapovirus nachweisbar
negativ	positiv	Zielgen nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Sapovirus ist nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation zeigt und eine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zu sehen ist.

Sapovirus ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-RNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control RNA im Nachweissystem zeigt.

Der Nachweis der Internal Control RNA ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der Internal Control RNA führen können.

Sapovirus ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-RNA keine Amplifikation, aber die Internal Control RNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control RNA ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-RNA für Sapovirus und die Internal Control RNA keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

12. Grenzen der Methode

1. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. Dieser Test ist nur für Stuhlproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Viruslast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA[®]GENE Sapovirus zu falsch negativen Ergebnissen führen.
6. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Zielsequenzen (ORF1) vorhanden sind.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Klinische Leistungsmerkmale

In einer retrospektiven klinischen Validierungsstudie wurden 86 extrahierte Stuhlproben mit dem RIDA®GENE Sapovirus Test und einer in-house real-time PCR an einem Institut in Frankreich untersucht.

Tab. 10: Korrelation der Sapovirus-Ergebnisse mit der RIDA®GENE Sapovirus real-time RT-PCR und Referenz in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			
		Positiv	Negativ	Insgesamt	
RIDA®GENE Sapovirus	Positiv	30	0	30	PPV: 100%
	Negativ	0	56	56	NPV: 100%
	Insgesamt	30	56	86	

13.2 Analytische Sensitivität

Die RIDA®GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 50 RNA-Kopien/Reaktion für Sapovirus.

Die folgende Abbildung 2 zeigt eine Verdünnungsreihe von Sapovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler® 480II.

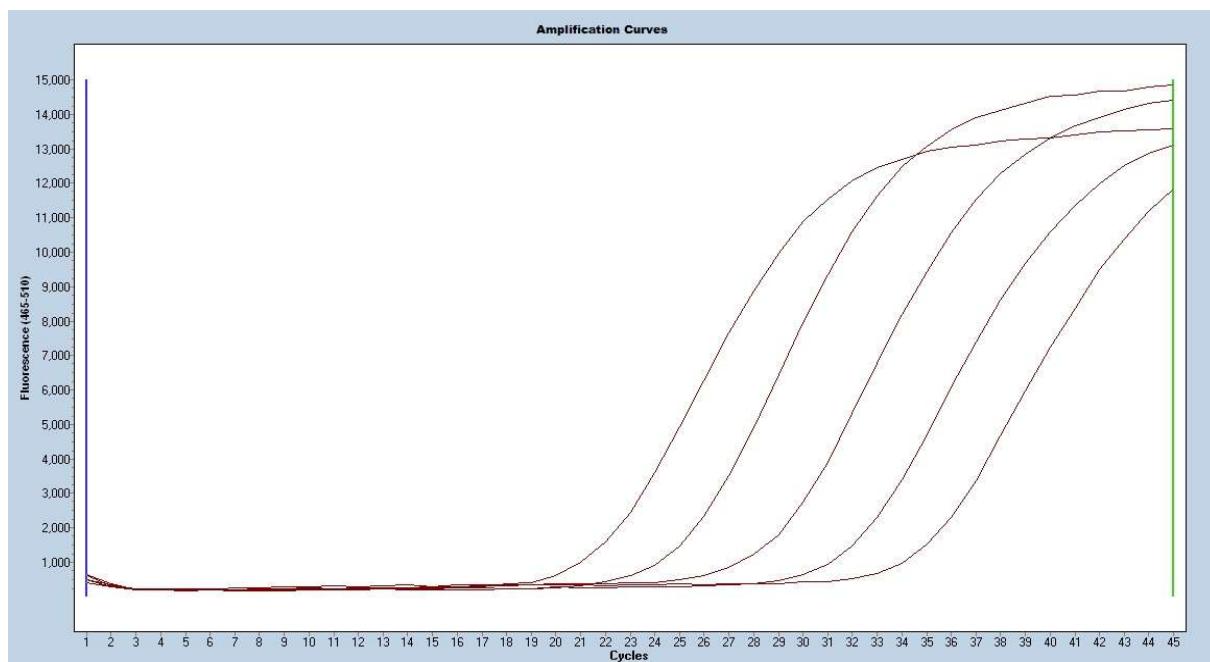


Abb. 2: Verdünnungsreihe Sapovirus ($10^5 - 10^1$ RNA Kopien/ μl) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, RNA-Extraktion und dem RNA-Gehalt.

13.3 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR ist spezifisch für Sapovirus. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab. 11):

Tab. 11: Kreuzreaktivitätstestung

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2018-06-11	Vorversion
2021-02-01	Generelle Überarbeitung 14. Versionsübersicht 15. Symbolerklärung

15. Symbolerklärung

Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro-Diagnostikum</i>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Herstell datum
	Hersteller

Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatur

1. Shigemoto N et al. Detection of *Norovirus*, *Sapovirus*, and human *Astrovirus* in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55: 369-372.
2. Chiba S et al. Sapporo Virus: History and recent findings. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(Suppl 2): S303-S308.
3. Johansson PJ et al. A nosocomial *Sapovirus*-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 200-204.
4. Lee LE et al. *Sapovirus* outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18: 873-876.
5. Nakata S et al. Prevalence of human *Calicivirus* infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3160-3163.
6. Wolfaardt M et al. Incidence of human *Calicivirus* and *Rotavirus* infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J. Med. Virol.* 1997, 51: 290-296.

English

RIDA®GENE Sapovirus

REF PG1605

1. Intended use

For *in vitro* diagnostic use. RIDA®GENE Sapovirus is a multiplex real-time RT-PCR for the direct, qualitative detection of Sapovirus from human stool samples.¹

RIDA®GENE Sapovirus real-time RT-PCR is intended for use as an aid in diagnosis of gastroenteritis caused by sapoviruses.

2. Summary and Explanation of the test

Sapoviruses, also called Sapporo Virus belong to the family of *Caliciviridae* and are classified as Sapporo-like viruses.² Together with the Norowalk-like viruses (Norovirus) they are the major causative agents of gastroenteritis worldwide. The name Sapovirus originated from the place of its first discovery, Sapporo, Japan in 1977 in an orphanage for small children. Even though highest incidence is described for children under the age of five, other studies also show Sapovirus outbreaks in adults.³ Clinical symptoms are similar to those of Norovirus infections including diarrhea, vomiting and fever. However self-limited Sapovirus infections lead to much milder gastroenteritis compared to Norovirus-induced gastroenteritis.

After its first discovery in Japan, further Sapovirus outbreaks were described in countries worldwide such as the USA, Canada, Africa and South Africa.^{4,5,6} There are at least 5 genogroups (GI – GV) described with GI, GII, GIV and GV being known to infect humans. Until today, little epidemiologic studies were conducted and Sapovirus was rarely detected due to lack of sensitive detection methods. Hence, real-time RT-PCR displays a major advantage in detection of gastroenteritis-causing Sapovirus infections.

3. Test principle

The RIDA[®]GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR is a molecular diagnostic test for the direct, qualitative detection of Sapovirus RNA from human stool samples. The detection is done in a one-step real-time RT-PCR format where the reverse transcription is followed by the PCR in the same reaction tube. The isolated RNA is transcribed into cDNA by a reverse transcriptase. Gene fragments specific for Sapovirus (ORF1, if present) are subsequently amplified by real-time PCR. The amplified targets are detected with hydrolysis probes, which are labeled at one end with a quencher and at the other end with a fluorescent reporter dye (fluorophore). In the presence of a target the probes hybridize to the amplicons. During the extension step the **Taq-Polymerase** breaks the reporter-quencher proximity. The reporter emits a fluorescent signal which is detected by the optical unit of a real-time PCR instrument. The fluorescence signal increases with the amount of formed amplicons. The RIDA[®]GENE Sapovirus assay contains an **Internal Control RNA** (ICR) as an internal control of sample preparation procedure and/or to determine possible PCR-inhibition.

4. Reagents provided

Tab. 1: Reagents provided (Reagents provided in the kit are sufficient for 100 determinations)

Kit Code	Reagent	Amount		Lid Color
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	yellow
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	red
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brown
N	No Template Control	1x	450 µl	white
P	Positive Control	1x	200 µl	blue

5. Storage instructions

- Protect all reagents from light and store at -20 °C. All reagents can be used until the expiration date. After expiry the quality guarantee is no longer valid.
- Carefully thaw reagents before using (e.g. in a refrigerator at 2 - 8 °C).
- Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance (e.g. after the first thawing separate it in aliquots and freeze immediately).
- During PCR preparation all the reagents should be stored cold in an appropriate way (2 - 8 °C).

6. Additional necessary reagents and necessary equipment

The RIDA[®]GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR assay is suitable for use with following extraction platforms and real-time PCR instruments:

Tab. 2: Necessary equipment

Extraction platform	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG™
Real-time PCR instruments	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Note: Only use 0.1 ml tubes on the Rotor-Gene Q (QIAGEN).

If you want to use other extraction platforms or real-time PCR instruments please contact R-Biopharm at mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) for use with the LightCycler[®] 480II and the LightCycler[®] 480 z
- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) for use with the LightCycler[®] 2.0
- Real-time PCR consumables (plates, tubes, foil)
- Centrifuge with a rotor for the reaction vials
- Vortexer
- Pipettes (0.5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- PCR water (BioScience grade, nuclease-free)

7. Precautions for users

For *in-vitro* diagnostic use.

- This test must only be carried out by trained laboratory personnel. The guidelines for working in medical laboratories have to be followed.
- The instruction manual for the test procedure has to be followed.
- Do not pipet samples or reagents by mouth. Avoid contact with bruised skin or mucosal membranes.
- During handling reagents or samples, wear appropriate safety clothing (appropriate gloves, lab coat, safety goggles) and wash your hands after finishing the test procedure.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or reagents are being used.
- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- Samples must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials being exposed to the samples and have to be handled according to the national safety regulations.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulations for disposal.

For more details see Safety Data Sheets (SDS) at www.r-biopharm.com

8. Collection and Storage

8.1 Sample preparation from stool samples

For RNA isolation of human stool samples, use a commercially available RNA extraction kit (e.g. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) or RNA extraction system (e.g. Maxwell® RSC (Promega)). Extract viral RNA according to the manufacturer's instructions.

We recommend to dilute the stool sample before extraction 1:10 with water. Vortex intensely and centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Use from the supernatant an appropriate volume according to the manufacturer's instruction.

The RIDA®GENE Sapovirus assay contains an **Internal Control RNA** that detects PCR inhibition, monitors reagent integrity and confirms that nucleic acid extraction was sufficient. The **Internal Control RNA** can either be used as PCR inhibition control or as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control.

If the **Internal Control RNA** is used only as a PCR inhibition control, 1 µl of the **Internal Control RNA** should be added to the Master- Mix (s. Tab. 4).

If the **Internal Control RNA** is used as a extraction control for the sample preparation procedure **and** as PCR inhibition control, 20 µl of the **Internal Control RNA** has to be added during extraction procedure. The **Internal Control RNA** should always be

added to the specimen-lysis buffer mixture and must not be added directly to the specimen. We also recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the negative control and Positive Control PCR Mix.

9. Test procedure

9.1 Master-Mix preparation

Calculate the total number of PCR reactions (sample and control reactions) needed. One Positive Control and one negative control must be included in each assay run.

We recommend to calculate an additional volume of 10 % to compensate imprecise pipetting (see Tab. 3, Tab. 4). Thaw, mix gently and centrifuge briefly the **Reaction Mix**, the **Enzyme Mix**, the **Positive Control**, the **No Template Control** and the **Internal Control RNA** before using. Keep reagents appropriately cold during working step (2 - 8 °C).

Tab. 3: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master Mix (ICR as extraction and PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

Tab. 4: Calculation and pipetting example for 10 reactions of the Master Mix (ICR only as PCR inhibition control)

Kit code	Master-Mix components	Volume per reaction	10 reactions (10 % extra)
1	Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
2	Enzyme Mix	0.7 µl	7.7 µl
R	Internal Control RNA	1.0 µl	11 µl
	Total	21.0 µl	231.0 µl

Mix the components of the Master-Mix gently and briefly spin down.

9.2 Preparation of the RT-PCR-Mix

Pipette 20 µl of the Master-Mix in each reaction vial (tube or plate).

Negative control: Add 5 µl **No Template Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR-Mix of the negative control.

Samples: Add 5 µl RNA-Extract to the pre-pipetted Master-Mix.

Positive Control: Add 5 µl **Positive Control** to the pre-pipetted Master-Mix.

Note: If the **Internal Control RNA** is used as extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, we recommend to add 1 µl of the **Internal Control RNA** to the RT-PCR Mix of the Positive Control .

Cover tubes or plate. Spin down and place in the real-time PCR instrument. The RT-PCR reaction should be started according to the PCR instrument set-up (see Tab. 5, Tab. 6).

9.3 PCR instrument set-up

9.3.1 Universal real-time RT-PCR profile

Tab. 5: Universal real-time RT-PCR profile for LightCycler® series

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and extension occur in the same step.

Tab. 6: Universal real-time RT-PCR profile for Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q and CFX96™

<u>Reverse Transcription</u>	10 min, 58 °C
Initial Denaturation	1 min, 95 °C
Cycles	45 Cycles
<u>PCR</u> Denaturation	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

Note: Annealing and extension occur in the same step

Note: The universal real-time PCR profile can also be used for DNA assays if RIDA®GENE DNA and RIDA®GENE RNA real-time PCR assays are combined in one run.

9.4 Detection channel set-up

Tab. 7: Selection of appropriate detection channels

Real-time PCR Instrument	Detection	Detection Channel	Note
Roche LightCycler® 2.0	Sapovirus	530	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) is required
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) is required
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovirus	FAM	Check that passive reference option ROX is none
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovirus	Green	The gain settings have to be set to 5
	ICR	Yellow	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovirus	FAM	Check that passive reference dye is none
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovirus	FAM	-
	ICR	VIC	

10. Quality Control

The analysis of the samples is done by the software of the used real-time PCR instrument according to the manufacturer's instructions. Positive Control and negative control have to show correct results (see Table 8, Fig. 1) in order to determine a valid run.

The **Positive Control** has a concentration of 10^3 copies/ μl . In each PCR run it is used in a total amount of 5×10^3 copies.

Tab. 8: For a valid run, the following conditions must be met:

Sample	Assay result	ICR Ct	Target Ct
Positive Control	Positive	NA *1	See Quality Assurance Certificate
Negative control	Negative	Ct > 20	0

*1 No Ct value is required for the ICR to make a positive call for the Positive Control.

If the Positive Control is not positive within the specified Ct range but the negative control is valid, prepare all new reactions including the controls.

If the negative control is not negative but the Positive Control is valid prepare all new reactions including the controls.

If the required criteria are not met, following items have to be checked before repeating the test:

- Expiry of the used reagents
- Functionality of the used instrumentation
- Correct performance of the test procedure

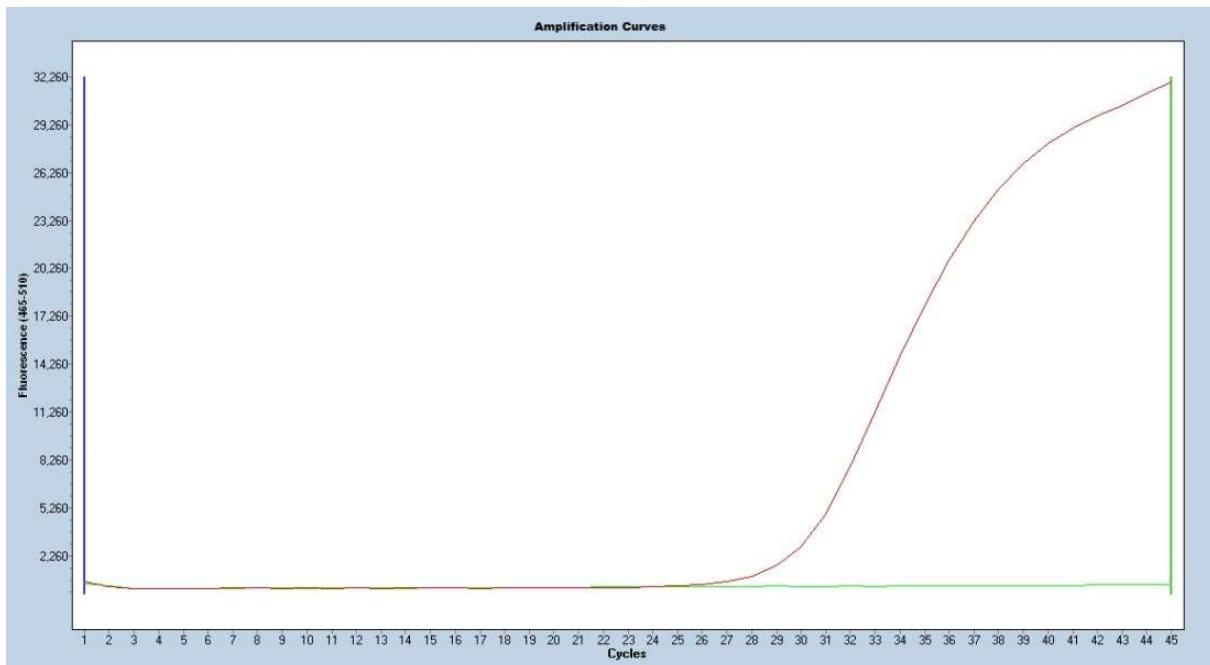


Fig.1: Correct run of the Positive Control and negative control (Sapovirus) on the LightCycler® 480II

11. Result interpretation

The result interpretation is done according to Table 9.

Tab.9: Sample interpretation

Sapovirus	ICR	Result
positive	positive/negative	Sapovirus detected
negative	positive	Target gene not detected
negative	negative	Invalid

Sapovirus is detected, if the sample RNA and the Internal Control RNA show an amplification signal in the detection system.

Sapovirus is also detected, if the sample RNA shows an amplification signal but none for the Internal Control RNA in the detection system. The detection of the Internal Control RNA is not necessary because high concentrations of the amplicon can cause a weak or absent signal of the Internal Control RNA.

Sapovirus is not detected, if the sample RNA shows no amplification signal, but an amplification signal for the Internal Control RNA in the detection system. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the detection of the Internal Control RNA.

A sample is invalid, if the sample RNA and Internal Control RNA show no amplification signal in the detection system. The sample contains a PCR inhibitor.

The extracted sample needs to be further diluted with PCR water (1:10) and re-amplified, or the isolation and purification of the sample has to be improved.

12. Limitations of the method

1. The result of molecular analysis should not lead to the diagnosis, but always be considered in the context of medical history and symptoms of the patient.
2. This assay is only validated for stool samples.
3. Inappropriate specimen collection, transport, storage and processing or a pathogen load in the specimen below the analytical sensitivity can result in false negative results.
4. The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
5. Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new variants resulting in a false negative result with the RIDA[®]GENE Sapovirus assay.
6. As with all PCR based *in vitro* diagnostic tests, extremely low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not be reproducible.
7. A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. However, a positive result is indicative for the presence of the target gene (ORF1).

13. Performance characteristics

13.1 Clinical performance

In a retrospective clinical validation study we analyzed 86 extracted human stool specimens with the RIDA[®]GENE Sapovirus assay and an in-house real-time PCR assay in an institute in France.

Tab.10: Correlation of the Sapovirus results with the RIDA[®]GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR and reference in-house real-time PCR.

		In-house real-time PCR			
		Positive	Negative	Total	
RIDA [®] GENE Sapovirus	Positive	30	0	30	PPV: 100%
	Negative	0	56	56	NPV: 100%
	Total	30	56	86	

13.2 Analytical sensitivity

The RIDA[®]GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR has a detection limit of ≥ 50 RNA copies per reaction for Sapovirus.

The following figure 2 shows a dilution series of Sapovirus (10^5 – 10^1 RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II.

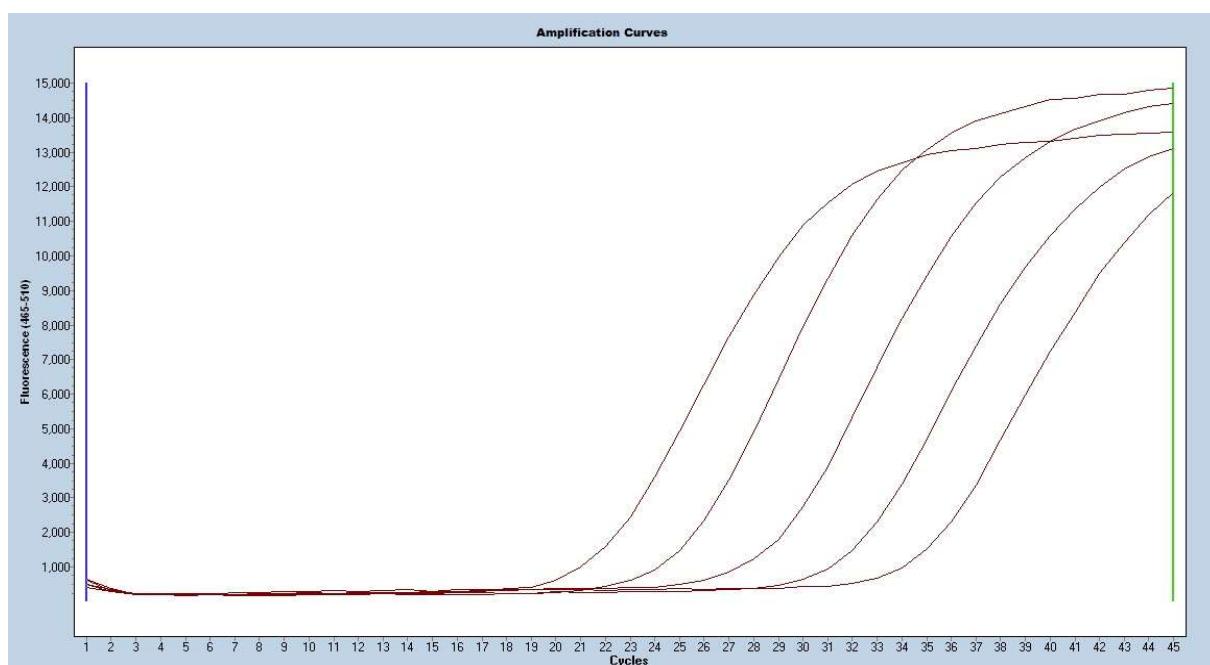


Fig. 2: Dilution series Sapovirus (10^5 – 10^1 RNA copies per μl) on the LightCycler[®] 480II

The detection limit of the whole procedure depends on the sample matrix, RNA extraction and RNA concentration.

13.3 Analytical specificity

The analytical specificity of the RIDA[®]GENE Sapovirus multiplex real-time RT-PCR is specific for Sapovirus from human stool samples. No cross-reaction could be detected for the following species (see Tab. 11):

Tab. 11: Cross-reactivity testing

Adenovirus 1, human, strain Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 7, human, strain Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, human, strain Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, Human, Strain Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

14. Version history

Version number	Chapter and designation
2018-06-11	Previous version
2021-02-01	General revision 10. Quality control (Spelling mistake) 14. Version history 15. Explanation of symbols

15. Explanation of symbols

General symbols

 IVD	For <i>in vitro</i> diagnostic use
 i	Consult instructions for use
 LOT	Lot number
 	Expiry
 	Store at
 REF	Article number
 Σ	Number of tests
 	Date of manufacture
 	Manufacturer

Testspecific symbols

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literature

1. Shigemoto N et al. Detection of *Norovirus*, *Sapovirus*, and human *Astrovirus* in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55: 369-372.
2. Chiba S et al. Sapporo Virus: History and recent findings. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(Suppl 2): S303-S308.
3. Johansson PJ et al. A nosocomial *Sapovirus*-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 200-204.
4. Lee LE et al. *Sapovirus* outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18: 873-876.
5. Nakata S et al. Prevalence of human *Calicivirus* infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3160-3163.
6. Wolfaardt M et al. Incidence of human *Calicivirus* and *Rotavirus* infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J. Med. Virol.* 1997, 51: 29

RIDA®GENE Sapovirus

REF PG1605

1. Uso previsto

Para el diagnóstico *in vitro*. RIDA®GENE Sapovirus es un ensayo de RT-PCR en tiempo real para la detección cualitativa directa de Sapovirus en muestras de heces humanas.¹

El ensayo de RT-PCR en tiempo real RIDA®GENE Sapovirus está concebido como una ayuda para el diagnóstico de gastroenteritis causada por Sapovirus.

2. Resumen y descripción del ensayo

Los Sapovirus, también llamados Sapporo Virus pertenecen a la familia de *Caliciviridae* y están clasificados como virus tipo Sapporo.² Junto con los virus tipo Norowalk (Norovirus) son los principales agentes causantes de gastroenteritis en todo el mundo. El nombre de Sapovirus es originario del sitio donde se descubrió primero, Sapporo, Japón, en 1977, en un orfanato para niños pequeños. Aun cuando la incidencia mayor se describe para niños menores de cinco años, otros estudios también muestran brotes de Sapovirus en adultos.³ Los síntomas clínicos son similares a aquellos de infecciones por Norovirus, entre los que se incluyen diarrea, vómito y fiebre. Sin embargo, las infecciones autolimitadas de Sapovirus causan gastroenteritis más leve comparadas con aquellas inducidas por el Norovirus.

Después de su primer descubrimiento en Japón, se describieron otros brotes de Sapovirus en países de todo el mundo, tales como Estados Unidos, Canadá, África y Sudáfrica.^{4,5,6} Existen al menos 5 genogrupos (GI - GV) descritos, de los cuales se sabe que GI, GII, GIV y GV infectan a los humanos. Al día de hoy, se realizaron pocos estudios epidemiológicos, y rara vez se detectaba el Sapovirus debido a la falta de métodos sensibles de detección. Por lo tanto, la RT-PCR en tiempo real proporciona una ventaja importante en la detección de infecciones por Sapovirus que causan gastroenteritis.

3. Principio del ensayo

El ensayo de RT-PCR múltiplex en tiempo real de RIDA®GENE Sapovirus es una prueba de diagnóstico molecular para la detección cualitativa directa de ARN de Sapovirus en muestras de heces humanas. La detección se lleva a cabo en un formato de RT-PCR en tiempo real en un paso, donde la transcripción inversa va seguida de la PCR en el mismo tubo de reacción. El ARN aislado se transcribe en ADNc por la acción de la transcriptasa inversa. Después, los fragmentos génicos específicos de Sapovirus (ORF1, si está presente) se amplifican por PCR en tiempo real. Las dianas amplificadas se detectan mediante sondas de hidrólisis, marcadas en un extremo con un extintor de fluorescencia y en el otro con un colorante fluorescente indicador (fluoróforo). En presencia de una diana, las sondas se hibridan a los amplicones. Durante el paso de extensión, la **Taq-Polymerase** rompe la proximidad del indicador-extintor. El indicador emite una señal fluorescente que se detecta en la unidad óptica de un equipo de PCR en tiempo real. La señal fluorescente aumenta en función de la cantidad de amplicones formados. El ensayo RIDA®GENE Sapovirus contiene un **Internal Control RNA** (ICR) como control interno del procedimiento de preparación de la muestra o para determinar la posible inhibición de la PCR.

4. Reactivos suministrados

Tabla 1: Reactivos suministrados (los reactivos del kit son suficientes para 100 determinaciones)

Código del kit	Reactivo	Cantidad		Color de la tapa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarilla
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	roja
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrón
N	No Template Control	1x	450 µl	blanca
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instrucciones de almacenamiento

- Todos los reactivos deben conservarse protegidos de la luz y a una temperatura de -20 °C. Todos los reactivos pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad. Después de la fecha de caducidad, la garantía de calidad ya no es válida.
- Descongele con cuidado los reactivos antes de usarlos (p. ej., en un refrigerador de 2 °C a 8 °C).

- Los reactivos admiten hasta 20 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afecte la eficacia diagnóstica del ensayo (p. ej., tras la primera descongelación, es conveniente dividir en alícuotas y congelar de inmediato).
- Durante la preparación de la PCR, todos los reactivos deben conservarse en frío de manera adecuada (entre 2 °C y 8 °C).

6. Reactivos adicionales necesarios y equipo necesario

El ensayo de RT-PCR múltiplex en tiempo real RIDA®GENE Sapovirus es adecuado para utilizarse con las siguientes plataformas de extracción y equipos de PCR en tiempo real:

Tabla 2: Equipamiento necesario

Plataforma de extracción	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Equipos de PCR en tiempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: Utilice únicamente tubos de 0,1 ml en el Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si desea utilizar otras plataformas de extracción o equipos de PCR en tiempo real, póngase en contacto con R-Biopharm en mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para uso con el LightCycler® 480II y el LightCycler® 480 z
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para uso con el LightCycler® 2.0
- Consumibles para PCR en tiempo real (placas, tubos, papel aluminio)
- Centrifuga y rotor para los viales de reacción
- Agitador vórtex
- Pipetas (0.5 a 20 µl, 20 a 200 µl, 100 a 1000 µl)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin talco
- Agua para PCR (agua de grado BioScience, sin nucleasas)

7. Precauciones para los usuarios

Para el diagnóstico *in vitro*.

- Este ensayo solo debe llevarlo a cabo personal de laboratorio capacitado. Respete las directrices para el trabajo en laboratorios médicos.
- Siga las indicaciones del manual de instrucciones para la ejecución del ensayo.
- No pipetee muestras ni reactivos con la boca. Evite el contacto con piel herida o mucosas.
- Durante la manipulación de reactivos o muestras, lleve ropa de seguridad adecuada (guantes apropiados, bata de laboratorio, gafas protectoras) y lávese las manos al finalizar la ejecución del ensayo.
- No fume, coma ni beba en las zonas en las que se estén utilizando las muestras o los reactivos.
- La extracción, la preparación de la PCR y la PCR propiamente dicha deben llevarse a cabo en diferentes salas para evitar la contaminación cruzada.
- Las muestras deben tratarse como potencialmente infecciosas, al igual que todos los reactivos y materiales expuestos a las muestras, y deben manipularse según las normativas nacionales de seguridad.
- No utilice el kit después de la fecha de caducidad.
- Todos los reactivos y materiales usados se deben eliminar correctamente después del uso. Consulte las normas nacionales pertinentes para la eliminación.

Para obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad (SDS) en www.r-biopharm.com.

8. Recolección y almacenamiento

8.1 Preparación de las muestras a partir de muestras de heces

Para el aislamiento del ARN a partir de muestras de heces humanas, use un kit de extracción de ARN (p. ej. RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema de extracción de ARN (p. ej., Maxwell® RSC [Promega]) disponibles en el mercado. Extraiga el ARN viral siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se recomienda diluir las muestras de heces 1:10 con agua antes de la extracción. Mezcle la muestra en un agitador vórtex a alta velocidad y centrifúguela a 13 000 x g durante 1 min. Use el volumen de sobrenadante adecuado, según las instrucciones del fabricante.

El ensayo RIDA®GENE Sapovirus contiene un **Internal Control RNA** que detecta la inhibición de la PCR, monitoriza la integridad de los reactivos y confirma que la extracción de ácidos nucleicos haya sido suficiente. El **Internal Control RNA** puede usarse como control de inhibición de la PCR o como control de extracción para el procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR.

Si el **Internal Control RNA** se usa únicamente como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla maestra (consulte la tabla 4).

Si el **Internal Control RNA** se usa como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras **y** como control de inhibición de la PCR, se deben agregar 20 µl de **Internal Control RNA** durante el procedimiento de extracción. El **Internal Control RNA** debe añadirse siempre a la mezcla de búfer de lisado de muestras **y no** directamente a la muestra. También se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para PCR del control negativo y del control positivo.

9. Ejecución del ensayo

9.1 Preparación de la mezcla maestra

Calcule el número total de reacciones de PCR necesarias (reacciones de muestra y de control). En cada ensayo debe incluirse un control positivo y un control negativo.

Se recomienda calcular un 10 % de volumen adicional para compensar las imprecisiones en el pipeteo (consulte las tablas 3 y 4). Descongele, mezcle suavemente y centrifugue brevemente la **Reaction Mix**, la **Enzyme Mix**, el **Positive Control**, el **No Template Control** y el **Internal Control RNA** antes de usarlos. Conserve los reactivos correctamente en frío (entre 2 °C y 8 °C) durante el paso de trabajo.

Tabla 3: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR como control de extracción y de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

Tabla 4: Ejemplo de cálculo y pipeteo para 10 reacciones de la mezcla maestra (ICR solo como control de inhibición de la PCR)

Código del kit	Componentes de la mezcla maestra	Volumen por reacción	10 reacciones (10 % adicional)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mezcle suavemente los componentes de la mezcla maestra y centrifúguelos brevemente.

9.2 Preparación de la mezcla para RT-PCR

Pipetee 20 µl de mezcla maestra en cada vial de reacción (tubo o placa).

Control negativo: Agregue 5 µl de **No Template Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control negativo.

Muestras: Agregue 5 µl de extracto de ARN a la mezcla maestra prepipeteada.

Control positivo: Añada 5 µl de **Positive Control** a la mezcla maestra prepipeteada.

Nota: Si el **Internal Control RNA** se utiliza como control de extracción del procedimiento de preparación de las muestras y control de inhibición de la PCR, se recomienda agregar 1 µl de **Internal Control RNA** a la mezcla para RT-PCR del control positivo.

Tape los tubos o la placa. Centrifúguelos y colóquelos en el equipo de PCR en tiempo real. La reacción de RT-PCR debe iniciarse según la configuración del equipo de PCR (consulte las tablas 5 y 6).

9.3 Configuración del equipo de PCR

9.3.1 Perfil universal por RT-PCR en tiempo real

Tabla 5: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real en el equipo serie LightCycler®

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u>	
Desnaturalización	10 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	15 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso

Tabla 6: Perfil universal por RT-PCR en tiempo real de Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q y CFX96™

<u>Transcripción inversa</u>	10 min, 58 °C
Desnaturalización inicial	1 min, 95 °C
Ciclos	45 ciclos
<u>PCR</u>	
Desnaturalización	15 s, 95 °C
Hibridación/Extensión	30 s, 60 °C
Velocidad de transición de la temperatura / Velocidad de rampa	Máxima

Nota: La hibridación y la extensión se llevan a cabo en el mismo paso

Nota: El perfil universal por PCR en tiempo real también puede usarse en los ensayos de ADN si se combinan en una corrida los ensayos de ADN RIDA®GENE y de ARN RIDA®GENE por PCR en tiempo real.

9.4 Configuración del canal de detección

Tabla 7: Selección de los canales de detección adecuados

Equipo de PCR en tiempo real	Detección	Canal de detección	Nota
Roche LightCycler® 2.0	Sapovirus	530	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002).
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovirus	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovirus	465/510	Se necesita el RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004).
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovirus	FAM	Compruebe que la opción de referencia pasiva ROX sea «none» (ninguna).
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovirus	Verde	La ganancia debe configurarse en 5.
	ICR	Amarillo	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovirus	FAM	Compruebe que el colorante de referencia pasivo sea «none» (ninguno).
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovirus	FAM	-
	ICR	VIC	

10. Control de Calidad

El software del equipo de PCR en tiempo real utilizado analiza las muestras según las instrucciones del fabricante. Los controles positivo y negativo deben mostrar los resultados correctos (consulte la tabla 8, figura 1) para determinar que un ensayo es válido.

El **Positive Control** tiene una concentración de 10^3 copias/ μl . En cada ensayo de PCR, se utiliza una cantidad total de 5×10^3 copias.

Tabla 8: Para que un ensayo sea válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:

Muestra	Resultado del ensayo	Ct del ICR	Ct de la diana
Control positivo	Positivo	ND * ¹	Consulte el certificado de garantía de calidad.
Control negativo	Negativo	Ct > 20	0

*¹ No se requiere un valor de Ct del ICR para determinar que el control positivo es positivo.

Si el control positivo no es positivo en el intervalo de Ct especificado, pero el control negativo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si el control negativo no es negativo pero el control positivo es válido, prepare de nuevo todas las reacciones, incluidos los controles.

Si no se cumplen los criterios requeridos, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir la prueba.

- Fecha de caducidad de los reactivos usados
- Funcionalidad de los equipos utilizados
- Ejecución correcta del procedimiento del ensayo.

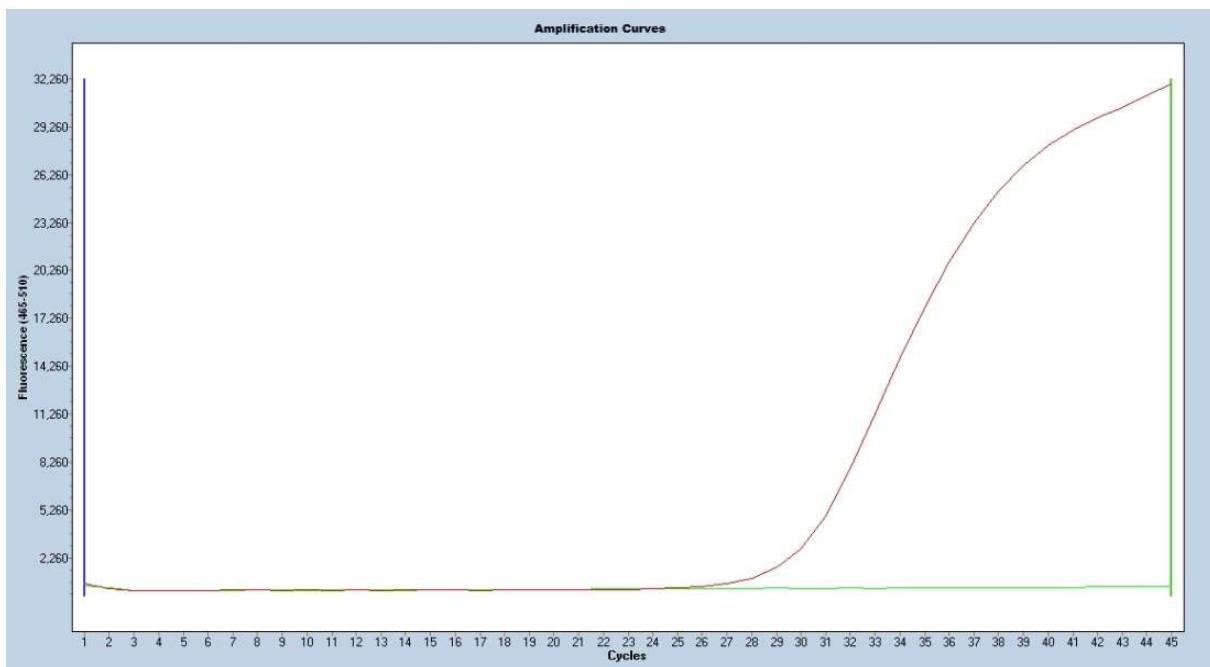


Fig.1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (Sapovirus) en el LightCycler® 480II

11. Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se lleva a cabo según la tabla 9.

Tabla 9: Interpretación de las muestras

Sapovirus	ICR	Resultado
positivo	positivo/negativo	Sapovirus detectado
negativo	positivo	Gen diana no detectado
negativo	negativo	No válido

Se detecta Sapovirus si el ARN de la muestra y el Internal Control RNA muestran una señal de amplificación en el sistema de detección.

También se detecta Sapovirus si hay señal de amplificación del ARN de la muestra, pero no del Internal Control RNA en el sistema de detección. La detección del Internal Control RNA no es necesaria debido a que las altas concentraciones del amplicón pueden hacer que la señal de Internal Control RNA sea débil o esté ausente.

El Sapovirus no se detecta si la muestra de ARN no muestra una señal de amplificación, pero hay señal de amplificación para el Internal Control RNA aparece en el sistema de detección. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la detección del Internal Control RNA.

La muestra no es válida si no hay señal de amplificación del ARN de la muestra y del Internal Control RNA en el sistema de detección. La muestra contiene un inhibidor de la PCR. Es necesario diluir con agua aún más la muestra extraída para PCR (1:10) y amplificarla de nuevo, o bien, mejorar el aislamiento y la purificación de la muestra.

12. Limitaciones del método

1. El resultado del análisis molecular no debe dar lugar a un diagnóstico, sino que debe considerarse siempre en el contexto del historial médico y los síntomas del paciente.
2. Este ensayo solo está validado para muestras de heces.
3. La obtención, transporte, almacenamiento y procesamiento incorrectos de la muestra, o una carga de patógenos en la muestra inferior a la sensibilidad analítica pueden dar lugar a resultados negativos falsos.
4. La presencia de inhibidores de la PCR puede ocasionar resultados no válidos.
5. Las mutaciones o polimorfismos en las regiones de unión del cebador o la sonda pueden afectar la detección de nuevas variantes, y producir un resultado negativo falso con el ensayo RIDA[®]GENE Sapovirus.
6. Como ocurre con todos los ensayos diagnósticos de PCR *in vitro*, podría detectarse un nivel sumamente bajo de la diana, por debajo del límite de detección (LoD), pero los resultados podrían no ser reproducibles.
7. Un resultado positivo del ensayo no indica necesariamente la presencia de microorganismos viables. No obstante, un resultado positivo indica la presencia del gen diana (ORF1).

13. Características de rendimiento

13.1 Eficacia diagnóstica clínica

En un estudio retrospectivo de validación clínica analizamos 86 muestras clínicas humanas con el ensayo RIDA®GENE Sapovirus y un ensayo interno de PCR en tiempo real en un instituto en Francia.

Tabla 10: Correlación de los resultados del Sapovirus con la prueba RT-PCR múltiplex en tiempo real de RIDA®GENE Sapovirus y el ensayo de referencia interno de PCR en tiempo real.

		PCR interno en tiempo real			
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE Sapovirus	Positivo	30	0	30	PPV: 100 %
	Negativo	0	56	56	NPV: 100 %
	Total	30	56	86	

13.2 Sensibilidad analítica

La prueba PCR múltiplex en tiempo real de RIDA®GENE Sapovirus tiene un límite de detección de ≥ 50 copias de ARN por reacción para Sapovirus.

La figura 2 a continuación muestra una dilución seriada de Sapovirus (10^5 – 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II.

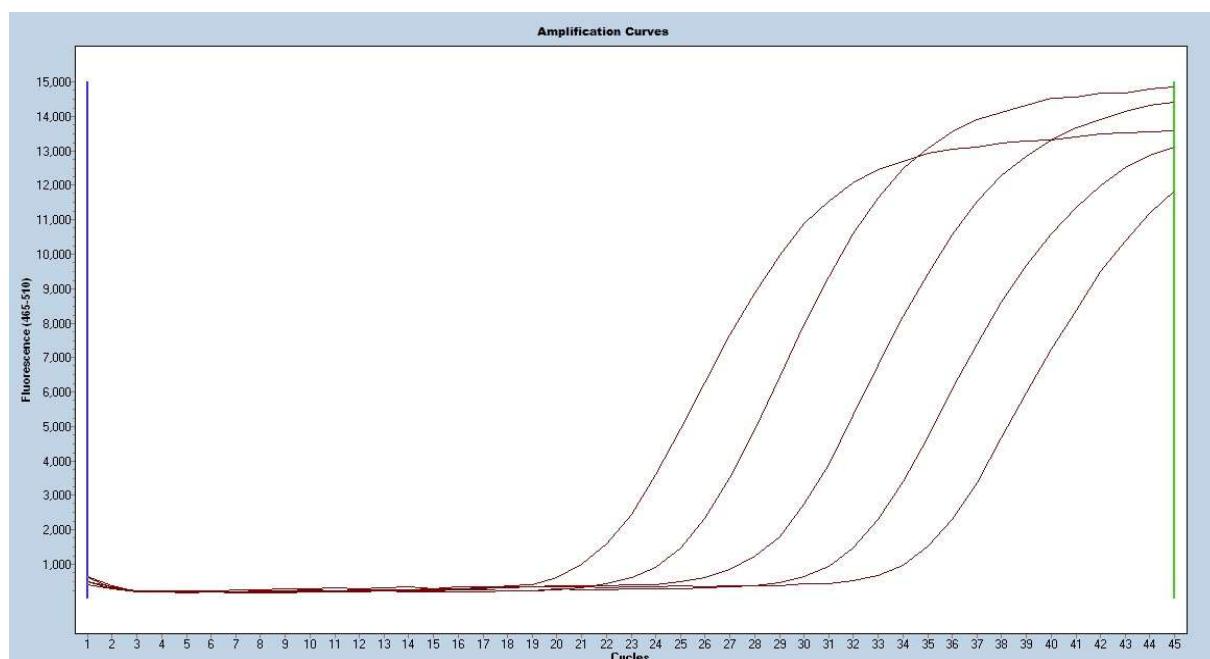


Fig. 2: Dilución seriada de Sapovirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

El límite de detección de todo el procedimiento depende de la matriz de la muestra, la extracción del ARN y la concentración del ARN.

13.3 Especificidad analítica

La especificidad analítica del ensayo de la prueba de PCR en tiempo real RIDA®GENE Sapovirus es específica para Sapovirus de muestras de heces humanas. No se detectaron reacciones cruzadas con las siguientes especies (consulte la tabla 11):

Tabla 11: Ensayos de reactividad cruzada

Adenovirus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subespecie. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB clon C6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subespecie <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

14. Historial de versiones

Número de versión	Capítulo y designación
2018-06-11	Versión anterior
2021-02-01	Revisión general 10. Control de calidad (Error ortográfico) 14. Historial de versiones 15. Explicación de los símbolos

15. Explicación de los símbolos

Símbolos generales

	Para el diagnóstico <i>in vitro</i> .
	Consulte las instrucciones de uso
	Número de lote
	Utilizable hasta
	Temperatura de almacenamiento
	Número de artículo
	Número de ensayos
	Fecha de fabricación
	Fabricante

Símbolos específicos del ensayo

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Referencias bibliográficas

1. Shigemoto N et al. Detection of *Norovirus*, *Sapovirus*, and human *Astrovirus* in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55: 369-372.
2. Chiba S et al. Sapporo Virus: History and recent findings. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(Suppl 2): S303-S308.
3. Johansson PJ et al. A nosocomial *Sapovirus*-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 200-204.
4. Lee LE et al. *Sapovirus* outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18: 873-876.
5. Nakata S et al. Prevalence of human *Calicivirus* infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3160-3163.
6. Wolfaardt M et al. Incidence of human *Calicivirus* and *Rotavirus* infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J. Med. Virol.* 1997, 51: 290-296.

RIDA®GENE Sapovirus

REF PG1605

1. Application

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA®GENE Sapovirus est un test de RT-PCR en temps réel multiplexe pour la détection qualitative directe du Sapovirus dans les échantillons de selles humaines¹.

Le test de RT-PCR en temps réel RIDA®GENE Sapovirus est destiné à faciliter le diagnostic de la gastroentérite provoquée par des sapovirus.

2. Résumé et explication du test

Les Sapovirus, aussi appelés virus Sapporo, appartiennent à la famille des *Caliciviridae* et sont classés dans les virus de type Sapporo². Avec les virus de type Norowalk (Norovirus), ce sont les principaux agents responsables de la gastro-entérite dans le monde entier. Le nom Sapovirus vient du lieu de sa découverte en 1977, à savoir Sapporo au Japon, dans un orphelinat pour jeunes enfants. Même si sa plus grande incidence est décrite chez les enfants âgés de moins de cinq ans, d'autres études signalent aussi des épidémies à Sapovirus chez les adultes³. Les symptômes cliniques sont similaires à ceux des infections à Norovirus, notamment diarrhée, vomissements et fièvre. Toutefois, les infections spontanément résolutives à Sapovirus provoquent une gastro-entérite bien plus modérée que les Norovirus. Après sa première découverte au Japon, d'autres épidémies à Sapovirus furent découvertes dans des pays du monde entier, comme aux États-Unis, au Canada, en Afrique et en Afrique du Sud^{4,5,6}. Il existe au moins 5 génogroupes (GI – GV), les génogroupes GI, GII, GIV et GV étant connus pour infecter l'être humain. À ce jour, de petites études épidémiologiques ont été effectuées et le Sapovirus a été rarement détecté en raison de l'absence de méthodes de détection sensibles. De ce fait, le RT-PCR en temps réel présente un avantage important dans la détection des infections à Sapovirus provoquant des gastro-entérites.

3. Principe du test

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA[®]GENE Sapovirus est un test de diagnostic moléculaire pour la détection qualitative directe de l'ARN de Sapovirus dans les échantillons de selles humaines. La détection se fait dans un format de RT-PCR en temps réel en une seule étape où la transcription inverse est suivie de la PCR dans le même tube de réaction. L'ARN isolé est transcrit en ADNc par une transcriptase inverse. Les fragments de gènes spécifiques aux Sapovirus (ORF1, si présent) sont ensuite amplifiés par PCR en temps réel. Les cibles amplifiées sont détectées grâce à des sondes pour hydrolyse qui sont marquées à une extrémité par un extincteur et à l'autre extrémité par un colorant fluorescent indicateur (fluorophore). En présence d'une cible, les sondes s'hybrident aux amplicons.

Pendant l'étape d'extension, la **Taq-Polymerase** rompt la proximité indicateur-extincteur. L'indicateur émet un signal de fluorescence qui est détecté par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel. Le signal de fluorescence augmente avec le nombre d'amplicons formés. Le test RIDA[®]GENE Sapovirus contient un **Internal Control RNA** (ICR) en tant que contrôle interne de la procédure de préparation des échantillons et/ou pour déterminer une éventuelle inhibition de la PCR.

4. Contenu du paquet

Tableau 1: Contenu du paquet (les réactifs fournis dans le kit permettent de réaliser 100 déterminations)

Code du kit	Réactif	Quantité		Couleur du couverc
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	jaune
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rouge
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	brun
N	No Template Control	1x	450 µl	blanc
P	Positive Control	1x	200 µl	bleu

5. Instructions de conservation des réactifs

- Protéger tous les réactifs de la lumière et les conserver à -20 °C. Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie.
- Décongeler délicatement tous les réactifs avant de les utiliser (par ex., dans un réfrigérateur entre 2 et 8 °C).

- Les réactifs peuvent supporter jusqu'à 20 cycles de congélation/décongélation sans que la performance du test ne soit affectée (par ex., après la première décongélation, séparer les réactifs en aliquotes et les congeler immédiatement).
- Pendant la préparation de la PCR, tous les réactifs doivent être conservés au frais de manière convenable (entre 2 et 8 °C).

6. Autres réactifs et matériel nécessaires

Le test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Sapovirus peut être utilisé avec les plateformes d'extraction et les instruments de PCR en temps réel suivants:

Tableau 2: Matériel nécessaire

Plateforme d'extraction	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Instruments de PCR en temps réel	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Remarque: utiliser uniquement des tubes de 0,1 ml sur le Rotor-Gene Q (QIAGEN).

Si vous souhaitez utiliser d'autres plateformes d'extraction ou instruments de PCR en temps réel, contactez R-Biopharm à l'adresse mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) pour une utilisation avec les appareils LightCycler® 480II et LightCycler® 480 z
- Kit de compensation de couleur RIDA®GENE II (PG0002) pour une utilisation avec l'appareil LightCycler® 2.0
- Consommables de PCR en temps réel (plaques, tubes, feuilles)
- Centrifugeuse avec rotor pour les flacons de réaction
- Agitateur-mélangeur vortex
- Pipettes (0,5 à 20 µl, 20 à 200 µl, 100 à 1 000 µl)
- Pointes à filtre
- Gants jetables sans poudre
- Eau de PCR (qualité BioScience, sans nucléase)

7. Mesures de précaution

Pour le diagnostic *in vitro*.

- Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux.
- Suivre le manuel d'instructions pour la réalisation du test.
- Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs à la bouche. Éviter tout contact avec une peau meurtrie ou les membranes muqueuses.
- Lors de la manipulation de réactifs ou d'échantillons, porter des vêtements de protection appropriés (gants adaptés, blouse, lunettes de protection) et se laver les mains à l'issue de la réalisation du test. Ne pas fumer, manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs sont utilisés.
- L'extraction, la préparation de la PCR et l'exécution de la PCR doivent être menées dans des salles différentes afin d'éviter toute contamination croisée.
- Les échantillons doivent être traités comme du matériel potentiellement infectieux de même que tous les réactifs et le matériel exposés aux échantillons. Ils doivent être manipulés conformément aux règlements nationaux en matière de sécurité.
- Ne pas utiliser le kit après sa date de péremption.
- Après utilisation, tous les réactifs et matériaux utilisés doivent être éliminés de façon appropriée. Veuillez vous conformer aux règlements nationaux applicables concernant la mise au rebut.

Pour en savoir plus, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) sur www.r-biopharm.com

8. Prélèvement et conservation

8.1 Préparation de l'échantillon à partir d'échantillons de selles

Pour isoler l'ARN des échantillons de selles humaines, utiliser un kit d'isolation d'ARN (par ex., RIDA® Xtract [R-Biopharm]) ou un système d'extraction d'ARN (par ex., Maxwell® RSC [Promega]) disponible dans le commerce. Extraire l'ARN conformément aux instructions du fabricant.

Il convient de diluer l'échantillon de selles avant extraction avec de l'eau selon un rapport de 1/10. Agiter fortement l'échantillon et le centrifuger à 13 000 x g pendant 1 min. Utiliser un volume adéquat de surnageant conformément aux instructions du fabricant.

Le test RIDA®GENE Sapovirus inclut un ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** qui détecte l'inhibition de la PCR, surveille l'intégrité du réactif et confirme que l'extraction d'acides nucléiques a été suffisante. L'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** peut être utilisé comme contrôle de l'inhibition de la PCR ou comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et en tant que contrôle de l'inhibition de la PCR.

Si le **Internal Control RNA** est utilisé uniquement comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange maître (voir tableau 4).

Si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon **et** comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 20 µl de **Internal Control RNA** pendant la procédure d'extraction. Le **Internal Control RNA** doit toujours être ajouté au mélange spécimen-tampon de lyse et **non** directement à l'échantillon. Il est aussi recommandé d'ajouter 1 µl d'ARN de contrôle interne **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif et contrôle positif de la PCR.

9. Réalisation du test

9.1 Préparation du mélange maître

Calculer le nombre total de réactions de PCR (réactions de l'échantillon et réactions de contrôle) nécessaires. Il faut inclure un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque exécution du test.

Nous recommandons de calculer un volume supplémentaire de 10 % pour compenser l'imprécision du pipetage (voir tableaux 3, 4). Décongeler, mélanger délicatement et centrifuger brièvement le **Reaction Mix**, le **Enzyme Mix**, le **Positive Control**, le **No Template Control** et le **Internal Control RNA** avant utilisation. Conserver les réactifs à une température assez basse durant l'étape de travail (entre 2 et 8 °C).

Tableau 3: Exemple de calcul et de pipettage pour 10 réactions du mélange maître (ICR comme pour l'extraction et contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

Tableau 4: Exemple de calcul et de pipettage pour 10 réactions du mélange maître (ICR uniquement comme pour le contrôle de l'inhibition de la PCR)

Code du kit	Composants du mélange maître	Volume par réaction	10 réactions (10 % de plus)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Mélanger les composants du mélange maître et les centrifuger brièvement.

9.2 Préparation du mélange pour la RT-PCR

Pipeter 20 µl du mélange maître dans chaque flacon de réaction (tube ou plaque).

Contrôle négatif: Ajouter 5 µl de contrôle sans matrice **No Template Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle négatif pour la RT-PCR.

Échantillons: Ajouter 5 µl d'extrait d'ARN au mélange maître pré-pipeté.

Contrôle positif: Ajouter 5 µl de **Positive Control** au mélange maître pré-pipeté.

Remarque: si le **Internal Control RNA** est utilisé comme contrôle de l'extraction pour la procédure de préparation de l'échantillon et comme contrôle de l'inhibition de la PCR, il convient d'ajouter 1 µl de **Internal Control RNA** au mélange de contrôle positif pour la RT-PCR.

Recouvrir les tubes ou la plaque. Les centrifuger et les placer dans l'instrument de PCR en temps réel. La réaction de RT-PCR devrait commencer conformément à la configuration de l'instrument de PCR (voir tableaux 5, 6).

9.3 Configuration de l'instrument de PCR

9.3.1 Profil universel de RT-PCR en temps réel

Tableau 5: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour la série LightCycler®

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	10 s, 95 °C
Hybridation/extension	15 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque: **l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape.**

Tableau 6: Profil universel de RT-PCR en temps réel pour Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q et CFX96™

<u>Transcription inverse</u>	10 min, 58 °C
Dénaturation initiale	1 min, 95 °C
Cycles	45 cycles
<u>PCR</u> Dénaturation	15 s, 95 °C
Hybridation/extension	30 s, 60 °C
Vitesse de transition de température / Vitesse de montée	Maximale

Remarque: **l'hybridation et l'extension se produisent au cours de la même étape**

Remarque: **Le profil universel de PCR en temps réel peut aussi être utilisé pour les tests d'ADN si les tests PCR en temps réel ADN RIDA®GENE et ARN RIDA®GENE sont combinés dans un même test.**

9.4 Configuration du canal de détection

Tableau 7: Sélection des canaux de détection adéquats

Instrument de PCR en temps réel	Détection	Canal de détection	Remarque
Roche LightCycler® 2.0	Sapovirus	530	RIDA®GENE Le kit de compensation de couleur II (PG0002) est nécessaire
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Le kit de compensation de couleur IV (PG0004) est nécessaire
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Le kit de compensation de couleur IV (PG0004) est nécessaire
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovirus	FAM	Vérifier que l'option de référence passive ROX n'est pas sélectionnée
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovirus	Vert	Les paramètres de gain doivent être réglés sur 5
	ICR	Jaune	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovirus	FAM	Vérifier que le colorant de référence passif n'est pas précisé
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovirus	FAM	-
	ICR	VIC	

10. Contrôle qualité

L'analyse des échantillons est effectuée par le logiciel de l'instrument de PCR en temps réel utilisé conformément aux instructions du fabricant. Le contrôle positif et le contrôle négatif doivent afficher des résultats corrects (voir tableau 8, figure 1) afin de déterminer qu'une série est valide.

Le **Positive Control** a une concentration de 10^3 copies/ μl . Chaque série de PCR utilise au total 5×10^3 copies de contrôle positif.

Tableau 8: Pour que l'exécution soit valide, les conditions suivantes doivent être satisfaites:

Échantillon	Résultat du test	Ct ICR	Ct cible
Positive Control	Positif	S/O * ¹	Voir Certificat d'assurance qualité
Negative control	Négatif	Ct > 20	0

*¹ Aucune valeur de Ct n'est requise pour que le résultat de l'ICR soit positif pour le contrôle positif.

Si le contrôle positif n'est pas positif dans la plage de Ct spécifiée, mais que le contrôle négatif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si le contrôle négatif n'est pas négatif, mais le contrôle positif est valide, préparer des réactions entièrement neuves y compris les contrôles.

Si les critères requis ne sont pas satisfait, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test:

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Fonctionnement de l'instrumentation utilisée
- Exécution correcte de la procédure de test

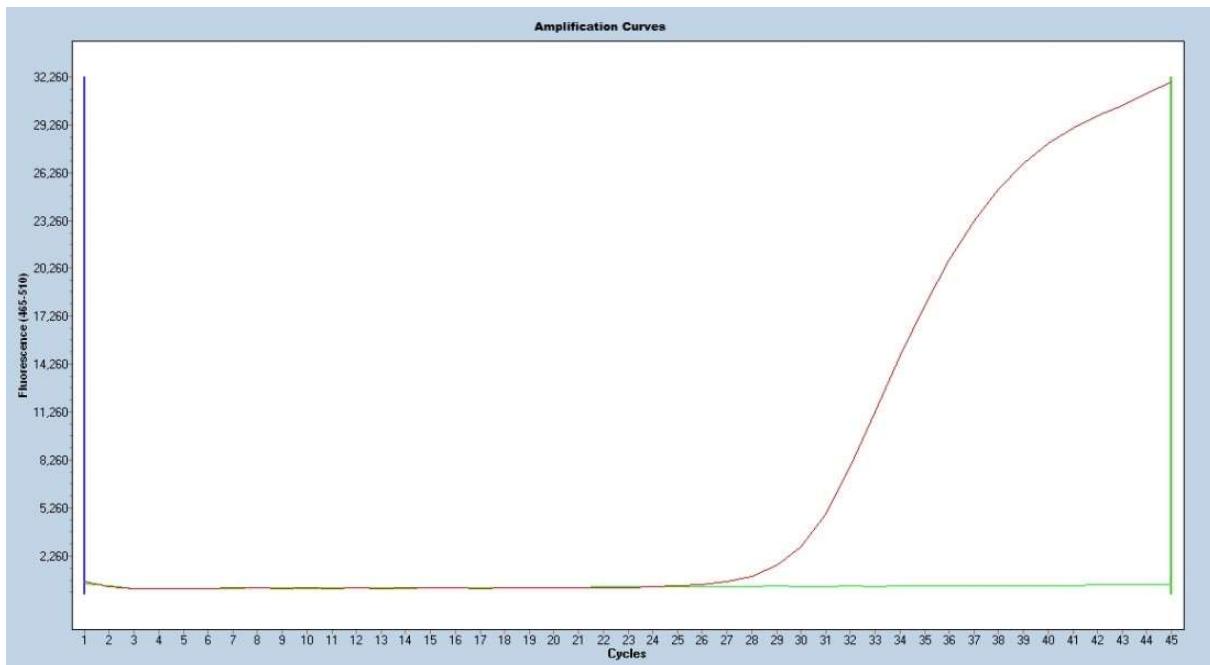


Fig.1: Exécution correcte des contrôles positif et négatif (Sapovirus) sur le LightCycler® 480II

11. Interprétation des résultats

Les résultats sont interprétés conformément au tableau 9.

Tableau 9: Interprétation des échantillons

Sapovirus	ICR	Résultat
positif	positif/négatif	Détection de Sapovirus
négatif	positif	Gène cible non détecté
négatif	négatif	Non valide

Sapovirus est détecté si l'ARN de l'échantillon et le Internal Control RNA présentent un signal d'amplification dans le système de détection.

Sapovirus est également détecté si l'ARN de l'échantillon présente un signal d'amplification dans le système de détection, mais aucun pour le Internal Control RNA. La détection du Internal Control RNA n'est pas nécessaire car les concentrations élevées de l'amplicon peuvent générer un signal faible ou absent du Internal Control RNA.

Sapovirus n'est pas détecté si l'ARN de l'échantillon ne présente aucun signal d'amplification dans le système de détection, mais en présente un pour le Internal Control RNA. Une inhibition de la réaction de PCR peut être exclue par la détection de l'ARN du contrôle interne Internal Control RNA.

Un échantillon est non valide si l'ARN de l'échantillon et l'ARN du contrôle interne **Internal Control RNA** ne présentent aucun signal d'amplification dans le système de détection. L'échantillon contient un inhibiteur de la PCR. L'échantillon extrait doit être encore dilué avec de l'eau de PCR (1/10) et de nouveau amplifié, ou il convient d'améliorer l'isolation et la purification de l'échantillon.

12. Limites de la méthode

1. Le résultat de l'analyse moléculaire ne doit pas mener au diagnostic, mais toujours être envisagé dans le contexte des antécédents médicaux et des symptômes du patient.
2. Ce test est seulement validé pour les échantillons de selles.
3. Un prélèvement, transport, stockage et traitement incorrects du spécimen ou une charge en agents pathogènes inférieure à la sensibilité analytique peuvent entraîner des résultats faux négatifs.
4. La présence d'inhibiteurs de la PCR peut donner lieu à des résultats non valides.
5. Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de liaison à l'amorce ou à la sonde peuvent empêcher la détection de nouveaux variants et donner lieu à un résultat faux négatif avec le test RIDA[®]GENE Sapovirus.
6. À l'instar de tous les tests de diagnostic *in vitro* de type PCR, des niveaux de la cible extrêmement bas sous la limite de détection (LDL) peuvent être détectés, mais les résultats peuvent ne pas être reproductibles.
7. Un résultat positif du test ne signifie pas nécessairement que des organismes viables sont présents. Cependant, un résultat positif indique la présence du gène cible (ORF1).

13. Performances

13.1 Performance clinique

Dans une étude de validation clinique rétrospective, nous avons analysé 86 échantillons de selles humaines avec le test RIDA®GENE Sapovirus et un test de PCR en temps réel interne dans un institut en France.

Tableau 10: Corrélation entre les résultats de Sapovirus obtenus avec le RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Sapovirus et le PCR en temps réel interne de référence.

		PCR en temps réel interne			
		Positif	Négatif	Total	
RIDA®GENE Sapovirus	Positif	30	0	30	PPV: 100%
	Négatif	0	56	56	NPV: 100%
	Total	30	56	86	

13.2 Sensibilité analytique

La limite de détection du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Sapovirus est ≥ 50 copies d'ARN par réaction pour Sapovirus.

La figure 2 ci-dessous présente une série de dilutions de Sapovirus ($10^5 - 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler® 480II.

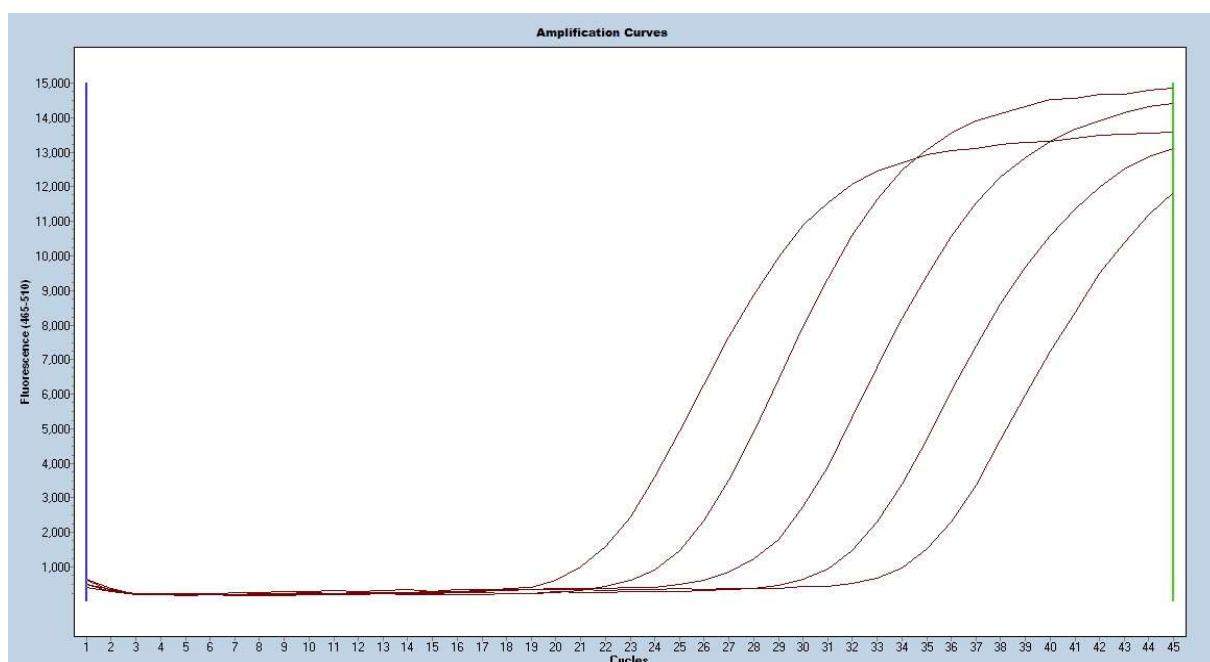


Figure 2: Série de dilutions pour Sapovirus ($10^5 - 10^1$ copies d'ARN par μl) avec le LightCycler® 480II

La limite de détection de l'ensemble de la procédure dépend de la matrice de l'échantillon, de l'extraction de l'ARN et de la concentration de l'ARN.

13.3 Spécificité analytique

La spécificité analytique du test de RT-PCR en temps réel multiplexe RIDA®GENE Sapovirus concerne Sapovirus dans les échantillons de selles humaines. Aucune réaction croisée n'a pu être détectée pour les espèces suivantes (voir tableau 11):

Tableau 11: Test de la réactivité croisée

Adénovirus 1, humain, souche Adénoïde 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-
Adénovirus 7, humain, souche Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adénovirus 40, humain, souche Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adénovirus 41, humain, souche Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifermentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

14. Historique des versions

Numéro de version	Chapitre et désignation
2018-06-11	Version précédente
2021-02-01	Révision générale 10. Contrôle qualité (faute de frappe) 14. Historique des versions 15. Signification des symboles

15. Signification des symboles

Symboles généraux

	Pour le diagnostic <i>In-vitro</i>
	Respecter le mode d'emploi
	Numéro de lot
	Date de péremption
	Température de stockage
	Numéro d'article
	Nombre de tests
	Date de fabrication
	Fabricant

Symboles spécifiques au test

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliographie

1. Shigemoto N et al. Detection of *Norovirus*, *Sapovirus*, and human *Astrovirus* in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55: 369-372.
2. Chiba S et al. Sapporo Virus: History and recent findings. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(Suppl 2): S303-S308.
3. Johansson PJ et al. A nosocomial *Sapovirus*-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 200-204.
4. Lee LE et al. *Sapovirus* outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18: 873-876.
5. Nakata S et al. Prevalence of human *Calicivirus* infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3160-3163.
6. Wolfaardt M et al. Incidence of human *Calicivirus* and *Rotavirus* infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J. Med. Virol.* 1997, 51: 290-296.

RIDA®GENE Sapovirus

REF PG1605

1. Campo di applicazione

Per la diagnostica *in vitro*, RIDA®GENE Sapovirus è un test RT-PCR real time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta di Sapovirus in campioni di fuci umane.¹

RIDA®GENE Sapovirus RT-PCR real time è adatto come ausilio nella diagnosi di gastroenterite causata dai Sapovirus.

2. Sintesi e spiegazione del test

I Sapovirus, che vengono definiti anche Sapporo Virus, appartengono alla famiglia dei *Caliciviridae* e sono classificati come virus Sapporo-simili.² Insieme ai virus Norowalk-simili (Norovirus) sono i principali agenti responsabili della gastroenterite in tutto il mondo. Il nome Sapovirus deriva dal luogo in cui nel 1977 vennero scoperti, ovvero Sapporo, in Giappone, in un orfanotrofio che ospitava bambini in tenera età. Nonostante l'incidenza massima venga riferita nei bambini di età inferiore ai cinque anni, altri studi indicano epidemie di Sapovirus negli adulti.³ I sintomi sono simili a quelli delle infezioni da Norovirus e includono diarrea, vomito e febbre. Tuttavia le infezioni da Sapovirus autolimitate causano una gastroenterite molto più leggera rispetto a quella indotta da Norovirus.

Dopo la prima scoperta in Giappone, sono state descritte altre epidemie di Sapovirus in Paesi di tutto il mondo come gli USA, il Canada, l'Africa e il Sud Africa.^{4,5,6} Sono stati descritti almeno 5 genogruppi (GI – GV) ed è noto che GI, GII, GIV e GV infettano l'uomo. Fino a oggi sono stati condotti pochi studi epidemiologici e il Sapovirus veniva rilevato solo raramente per la mancanza di metodi di rivelazione sensibili. Pertanto, il test RT-PCR real time offre un vantaggio importante nella rivelazione delle infezioni da Sapovirus all'origine della gastroenterite.

3. Principio del test

Il test RIDA®GENE Sapovirus RT-PCR real time multiplex è un test diagnostico molecolare per la rivelazione qualitativa diretta di RNA Sapovirus in campioni di fuci umane. La rivelazione avviene mediante RT-PCR real-time in una singola fase, durante la quale la PCR segue la trascrizione inversa nella stessa provetta di reazione. L'RNA isolato viene trascritto in cDNA mediante trascrittasi inversa. I

frammenti genetici specifici di Sapovirus (ORF1, se presente) vengono successivamente amplificati mediante PCR real time. I target amplificati vengono rivelati con sonde a idrolisi marcate su un'estremità con un quencher e sull'altra con un colorante fluorescente (fluoroforo). In presenza di un target, le sonde ibridano con gli ampliconi. Durante la fase di estensione, la **Taq-Polymerase** rompe la prossimità fra rivelatore (reporter) e attenuatore (quencher). Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Sapovirus contiene un **Internal Control RNA** (ICR) quale controllo interno della procedura di preparazione dei campioni e/o per la determinazione della possibile inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tab. 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	giallo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	rosso
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	marrone
N	No Template Control	1x	450 µl	bianco
P	Positive Control	1x	200 µl	blu

5. Istruzioni di conservazione

- Proteggere tutti i reagenti dalla luce e conservare a una temperatura di -20 °C. Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Dopo la scadenza, la garanzia di qualità non è più valida.
- Scongelare accuratamente i reagenti prima dell'uso (ad esempio in un frigorifero a 2 - 8 °C).
- I reagenti possono sopportare fino a 20 cicli di congelamento/scongelamento senza compromettere i test (ad esempio dopo il primo scongelamento separare il reagente in aliquote e ricongelare immediatamente).
- Durante la preparazione della PCR tutti i reagenti devono essere conservati al freddo in modo appropriato (2 - 8 °C).

6. Reagenti aggiuntivi e dispositivi necessari

Il test RIDA[®]GENE Sapovirus RT-PCR real-time multiplex è adatto per l'uso con le piattaforme di estrazione e gli strumenti per la PCR real-time elencati di seguito:

Tab. 2: Attrezzatura necessaria

Piattaforma di estrazione	
R-Biopharm	RIDA [®] Xtract
Promega	Maxwell [®] RSC
bioMérieux	NucliSENS easy [®] MAG™
Strumenti per la PCR real-time	
Roche	LightCycler [®] 2.0, LightCycler [®] 480II, LightCycler [®] 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Nota: sullo strumento Rotor-Gene Q (QIAGEN) utilizzare solo provette da 0,1 ml.

Se si desidera utilizzare altre piattaforme di estrazione o strumenti per la PCR real-time, contattare R-Biopharm all'indirizzo mdx@r-biopharm.de.

- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) per l'uso con LightCycler[®] 480II e LightCycler[®] 480 z
- RIDA[®]GENE Color Compensation Kit II (PG0002) per l'uso con LightCycler[®] 2.0
- Materiali di consumo per PCR real-time (piastre, provette, fogli)
- Centrifuga con rotore per cuvette di reazione
- Agitatore a vortice
- Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Puntali con filtro
- Guanti monouso senza talco
- Acqua per PCR (grado bioscientifico, priva di nucleasi)

7. Precauzioni per gli utilizzatori

Per la diagnostica *in vitro*.

- Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.
- Attenersi al manuale di istruzioni per l'esecuzione del test.
- Non pipettare campioni o reagenti con la bocca. Evitare il contatto con lesioni cutanee o mucose.
- Quando si maneggiano reagenti o campioni, indossare abbigliamento di sicurezza adeguato (guanti, camice, occhiali di sicurezza idonei) e lavarsi le mani dopo l'esecuzione del test.
- Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.
- L'estrazione, la preparazione della PCR e l'esecuzione della PCR devono avvenire in stanze separate per evitare contaminazione crociata.
- I campioni devono essere trattati come potenzialmente infettivi, così come tutti i reagenti e i materiali esposti ai campioni, e devono essere maneggiati nel rispetto delle disposizioni di sicurezza nazionali.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Tutti i reagenti e i materiali utilizzati devono essere smaltiti correttamente dopo l'uso. Attenersi alle disposizioni nazionali in vigore in materia di smaltimento.

Per maggiori informazioni consultare le schede di dati di sicurezza (SDS) all'indirizzo www.r-biopharm.com

8. Raccolta e conservazione

8.1 Preparazione del campione da campioni fecali

Per l'isolamento dell'RNA da campioni di fuci umane, utilizzare un kit di estrazione dell'RNA disponibile in commercio (ad es. RIDA® Xtract (R-Biopharm)) o un sistema di estrazione dell'RNA (ad es. Maxwell® RSC (Promega)). Estrarre l'RNA virale in base alle istruzioni del produttore.

Prima dell'estrazione, si raccomanda di diluire il campione di fuci con acqua in rapporto 1:10. Vorticare vigorosamente e centrifugare a 13.000 x g per 1 minuto. Utilizzare il volume appropriato di surnatante in base alle istruzioni del produttore.

Il kit RIDA®GENE Sapovirus contiene un **Internal Control RNA** che rivela l'inibizione della PCR, controlla l'integrità del reagente e verifica che l'estrazione dell'acido nucleico sia sufficiente. L' **Internal Control RNA** può essere utilizzato come controllo dell'inibizione della PCR o come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR.

Se l' **Internal Control RNA** viene usato solo come controllo di inibizione della PCR, aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix (vedere Tab. 4).

Se l' **Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione **e** come controllo di inibizione della PCR, aggiungere

20 µl di **Internal Control RNA** durante la procedura di estrazione.

L' **Internal Control RNA** deve sempre essere aggiunto alla miscela tampone di lisi del campione e **non** direttamente al campione. Si raccomanda inoltre di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla PCR Mix di controllo positivo e negativo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Calcolare il numero totale di reazioni di PCR (reazioni campione e di controllo) necessarie. Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

Si raccomanda di calcolare un volume aggiuntivo del 10 % a compensazione di un pipettaggio non preciso (vedere Tab. 3, Tab. 4). Prima dell'uso scongelare, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente la **Reaction Mix**, l'**Enzyme Mix**, il **Positive Control**, il **No Template Control** e l'**Internal Control RNA**. Durante la fase di lavorazione tenere i reagenti adeguatamente refrigerati (2-8 °C).

Tab. 3: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR come controllo di estrazione e di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20 µl	220 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

Tab. 4: Esempio di calcolo e pipettaggio per 10 reazioni della Master Mix (ICR solo come controllo di inibizione della PCR)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Volume per reazione	10 reazioni (10% extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,0 µl	231,0 µl

Miscelare con cura i componenti della Master Mix ed eseguire un breve spin down.

9.2 Preparazione della mix per RT-PCR

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (provetta o piastra).

Controllo negativo: dispensare 5 µl di **No Template Control** nella Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo negativo.

Campioni: dispensare 5 µl di RNA Extract nella Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: dispensare 5 µl di **Positive Control** alla Master Mix pre-pipettata.

Nota: se l'**Internal Control RNA** viene usato come controllo di estrazione per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della PCR, si raccomanda di aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla RT-PCR Mix del controllo positivo.

Coprire le provette o la piastra. Eseguire lo spin down e collocarle nello strumento per PCR real time. La reazione RT-PCR deve essere avviata in base all'impostazione dello strumento per PCR (vedere Tab. 5, Tab. 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo RT-PCR real-time universale

Tab. 5: Profilo universale RT-PCR real-time per la serie LightCycler®

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u>	
Denaturazione	10 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	15 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Tab. 6: Profilo universale RT-PCR per Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u>	
Denaturazione	15 s, 95 °C
Appaiamento/Estensione	30 s, 60 °C
Velocità di transizione della temperatura / velocità di rampa	Massima

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Nota: il profilo per PCR real-time universale può essere utilizzato anche per i test del DNA se i test PCR real-time del DNA RIDA®GENE e dell'RNA RIDA®GENE vengono combinati in un unico ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tab. 7: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Nota
Roche LightCycler® 2.0	Sapovirus	530	È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovirus	465/510	È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovirus	465/510	È necessario il RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovirus	FAM	Controllare che l'opzione di riferimento passivo ROX sia impostata su nessuno
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovirus	Verde	Le impostazioni di amplificazione (gain) devono essere regolate su 5
	ICR	Giallo	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovirus	FAM	Controllare che non vi sia colorante di riferimento passivo
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovirus	FAM	-
	ICR	VIC	

10. Controllo qualità

L'analisi dei campioni viene eseguita dal software dello strumento per PCR real-time utilizzato, in base alle istruzioni del produttore. Perché l'esecuzione sia valida, i controlli positivo e negativo devono mostrare risultati corretti (vedere Tabella 8, Fig. 1).

Il **Positive Control** ha una concentrazione di 10^3 copie/ μl . In ogni ciclo di PCR viene usato in una quantità totale di 5×10^3 copie.

Tab. 8: Perché l'esecuzione sia valida occorre che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

Campione	Risultato del test	Ct ICR	Ct Target
Positive Control	Positivo	NA *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Controllo negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 Per ottenere un risultato positivo del controllo positivo non occorre un valore Ct per l'ICR.

Se il controllo positivo non è positivo nel range Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, preparare tutte le reazioni nuove includendo i controlli.

Se i criteri richiesti non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità della strumentazione utilizzata
- Corretta esecuzione del test

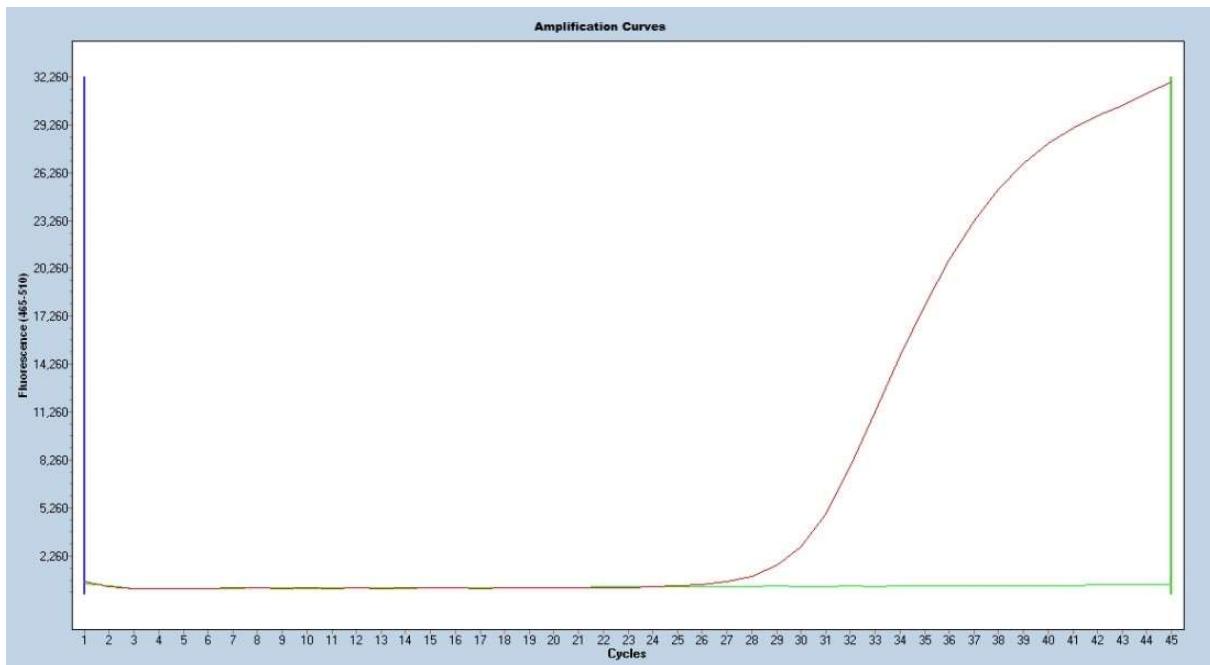


Fig.1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Sapovirus) sul LightCycler® 480II

11. Interpretazione del risultato

Il risultato viene interpretato in base alla Tabella 9.

Tab.9: Interpretazione del campione

Sapovirus	ICR	Risultato
positivo	positivo/negativo	Sapovirus rivelato
negativo	positivo	Gene target non rivelato
negativo	negativo	Non valido

Sapovirus è comprovabile se sia l'RNA del campione sia l'Internal Control RNA mostrano un segnale di amplificazione nel sistema di rivelazione.

Sapovirus è inoltre comprovabile se l'RNA del campione mostra un segnale di amplificazione, ma nessun segnale per l'Internal Control RNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'Internal Control RNA non è necessaria, in quanto elevate concentrazioni dell'amplicone possono far sì che il segnale dell'Internal Control RNA sia debole o assente.

Sapovirus non è comprovabile se l'RNA del campione non mostra alcun segnale di amplificazione, ma è presente un segnale per l'Internal Control RNA nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell'Internal Control RNA esclude l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l'**Internal Control RNA** mostrano segnali di amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene un inibitore della PCR. Il campione estratto deve essere ulteriormente diluito con acqua per PCR (1:10) e ri-amplificato, oppure occorre migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il risultato dell'analisi molecolare non deve condurre alla diagnosi, ma deve essere sempre considerato nel contesto dell'anamnesi medica e dei sintomi del paziente.
2. Questo test è convalidato solo per campioni di feci.
3. Procedure errate di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni o un carico di agenti patogeni nei campioni al di sotto della sensibilità analitica possono produrre falsi negativi.
4. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi.
5. Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame del primer o della sonda possono influenzare la rilevazione di nuove varianti e causare un risultato falso negativo con il test RIDA[®]GENE Sapovirus.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, livelli estremamente bassi di target sotto il limite di rivelazione (LoD) possono essere rivelati, ma i risultati potrebbero non essere riproducibili.
7. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Tuttavia, un risultato positivo è indicativo della presenza del gene target (ORF1).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Prestazioni cliniche

In uno studio di validazione clinica retrospettiva condotto presso un istituto in Francia abbiamo analizzato 86 campioni fecali umani estratti con il test RIDA[®]GENE Sapovirus e con un test di PCR real time interno.

Tab.10: Confronto tra i risultati relativi al Sapovirus con RIDA[®]GENE Sapovirus RT-PCR real time multiplex e con il test PCR real time interno di riferimento.

		Test di PCR real-time interno			
		Positivo	Negativo	Totale	
RIDA [®] GENE Sapovirus	Positivo	30	0	30	PPV: 100%
	Negativo	0	56	56	NPV: 100%
	Totale	30	56	86	

13.2 Sensibilità analitica

Il test RIDA[®]GENE Sapovirus RT-PCR real time multiplex ha un limite di rivelazione ≥ 50 copie di RNA per reazione per Sapovirus.

La figura 2 che segue mostra una serie di diluizioni di Sapovirus ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) su LightCycler[®] 480II

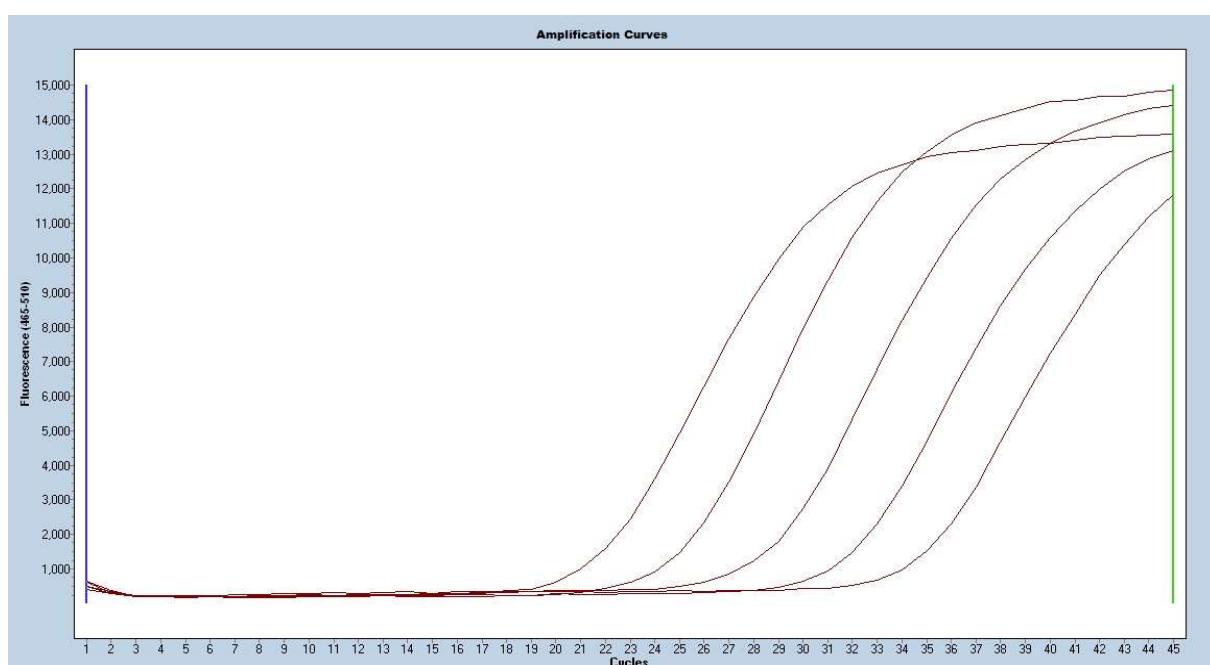


Fig. 2: Serie di diluizione di Sapovirus ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler[®] 480II

Il limite di rivelazione dell'intera procedura dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione dell'RNA e dalla concentrazione di RNA.

13.3 Specificità analitica

La specificità analitica del test RIDA[®]GENE Sapovirus RT-PCR real time multiplex è specifica per il Sapovirus in campioni di feci umane. Non è stata rivelata alcuna reazione crociata per le seguenti specie (vedere Tab. 11):

Tab. 11: Test di reattività crociata

Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavirus	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifirmentans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovirus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> sottosp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Capitolo e designazione
2018-06-11	Versione precedente
2021-02-01	Revisione generale 10. Controllo qualità (errore d'ortografia) 14. Cronologia delle versioni 15. Descrizione dei simboli

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

 IVD	Diagnostica <i>in vitro</i>
 i	Leggere il foglio illustrativo
 LOT	Codice identificativo
 F	Utilizzabile fino a
 T	Temperatura di conservazione
 REF	Numero articolo
 Σ	Quantità di test
 C	Data di produzione
 P	Produttore

Simboli specifici nel testo

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Bibliografia

1. Shigemoto N et al. Detection of *Norovirus*, *Sapovirus*, and human *Astrovirus* in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55: 369-372.
2. Chiba S et al. Sapporo Virus: History and recent findings. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(Suppl 2): S303-S308.
3. Johansson PJ et al. A nosocomial *Sapovirus*-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 200-204.
4. Lee LE et al. *Sapovirus* outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18: 873-876.
5. Nakata S et al. Prevalence of human *Calicivirus* infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3160-3163.
6. Wolfaardt M et al. Incidence of human *Calicivirus* and *Rotavirus* infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J. Med. Virol.* 1997, 51: 290-296.

Português

RIDA®GENE Sapovirus

REF PG1605

1. Uso previsto

Para utilização em diagnóstico *in-vitro*. O RIDA®GENE Sapovirus é um RT-PCR multiplex em tempo real para a detecção direta e qualitativa de sapovírus a partir de amostras de fezes humanas.¹

O RT-PCR RIDA®GENE Sapovirus em tempo real destina-se ao uso como auxílio no diagnóstico de gastroenterite causada por sapovírus.

2. Sumário e explicação do teste

Os sapovírus, também chamados de Vírus Sapporo, pertencem à família de *Caliciviridae* e são classificados como vírus do tipo Sapporo.² Juntamente com os vírus do tipo Norowalk (norovírus), eles são os principais agentes causadores de gastroenterite no mundo. O nome Sapovírus originou-se no local de sua primeira descoberta, Sapporo, no Japão, em 1977, em um orfanato para crianças pequenas. Embora a incidência mais alta seja descrita para crianças com menos de cinco anos de idade, outros estudos também mostram surtos de sapovírus em adultos.³ Os sintomas clínicos são semelhantes aos das infecções por norovírus, incluindo diarreia, vômito e febre. No entanto, infecções por sapovírus autolimitadas levam a gastroenterite muito mais leve em comparação com a gastroenterite induzida por norovírus.

Após sua primeira descoberta no Japão, foram descritos novos surtos de sapovírus em países do mundo, como EUA, Canadá, África e África do Sul.^{4,5,6} Existem pelo menos 5 genogrupos (GI - GV) descritos com GI, GII, GIV e GV sendo conhecidos por infectar seres humanos. Até hoje, poucos estudos epidemiológicos eram realizados e o sapovírus raramente era detectado devido à falta de métodos de detecção sensíveis. Portanto, o RT-PCR em tempo real apresenta uma grande vantagem na detecção de infecções por sapovírus causadoras de gastroenterite.

3. Princípio do teste

O RT-PCR RIDA®GENE Sapovirus multiplex em tempo real é um teste de diagnóstico molecular para a detecção direta e qualitativa do RNA do sapovírus a partir de amostras de fezes humanas. A detecção é efetuada num formato de RT-PCR em tempo real numa única etapa, onde a transcrição reversa é seguida pela PCR no mesmo tubo de reação. O RNA isolado é transcrito para cDNA por uma transcriptase reversa. Os fragmentos de genes específicos de sapovírus (ORF1, se presente) são subsequentemente amplificados pelo PCR em tempo real. Os alvos amplificados são detectados com sondas de hidrólise, que estão marcadas em uma extremidade com um supressor e na outra extremidade com um corante repórter fluorescente (fluoróforo). Na presença de um alvo, as sondas hibridizam para os fragmentos amplificados. Durante a fase de extensão, a **Taq-Polymerase** quebra a proximidade entre o repórter e o supressor. O repórter emite um sinal fluorescente que é detectado pela unidade ótica de um instrumento de PCR em tempo real. O sinal fluorescente aumenta com a quantidade de fragmentos amplificados formados. O teste RIDA®GENE Sapovirus contém um **Internal Control RNA** (ICR) como um monitoramento interno do procedimento de preparação de amostra a fim de determinar a eventual inibição da PCR.

4. Reagentes fornecidos

Tab. 1: Reagentes fornecidos (Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 100 determinações)

Código do kit	Reagente	Quantidade		Cor da tampa
1	Reaction Mix	2x	1050 µl	amarelo
2	Enzyme Mix	1x	80 µl	vermelho
R	Internal Control RNA	2x	1700 µl	castanho
N	No Template Control	1x	450 µl	branco
P	Positive Control	1x	200 µl	azul

5. Instruções de armazenamento

- Proteja todos os reagentes da luz e armazene a -20 °C. Todos os reagentes podem ser usados até ao fim do prazo de validade. Depois de vencido o prazo, a garantia da qualidade já não é válida.
- Descongele cuidadosamente os reagentes antes de usar (por ex., em um frigorífico a 2 - 8 °C).
- Os reagentes podem sustentar até 20 ciclos de congelamento sem influenciar o desempenho do teste (por ex., após o primeiro descongelamento, separe-os em alíquotas e congele-os imediatamente).
- Durante a preparação da PCR, todos os reagentes devem ser conservados a frio de forma adequada (2 - 8 °C).

6. Reagentes adicionais e equipamentos necessários

O teste de RT-PCR RIDA®GENE Sapovirus multiplex em tempo real é adequado para ser usado com as seguintes plataformas de extração e instrumentos de PCR em tempo real:

Tab. 2: Equipamento necessário

Plataforma de extração	
R-Biopharm	RIDA® Xtract
Promega	Maxwell® RSC
bioMérieux	NucliSENS easy®MAG™
Instrumentos de PCR em tempo real	
Roche	LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II, LightCycler® 480 z
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™
QIAGEN	Rotor-Gene Q

Indicação: No Rotor-Gene Q (QIAGEN), use apenas tubos de 0,1 ml.

Se quiser usar outras plataformas de extração ou instrumentos de PCR em tempo real, entre em contato com a R-Biopharm em mdx@r-biopharm.de.

- RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) para ser usado com o LightCycler® 480II e o LightCycler® 480 z
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) para ser usado com o LightCycler® 2.0
- Consumíveis de PCR em tempo real (placas, tubos, película)
- Centrífuga com um rotor para tubos de ensaio
- Vortexer

- Pipetas (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Ponteiras de filtro
- Luvas descartáveis sem pó
- Água PCR (Grau BioScience, livre de nuclease)

7. Avisos e medidas preventivas para os usuários

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

- Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas.
- O manual de instruções de realização do teste deve ser seguido.
- Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com membranas mucosas ou pele com hematoma.
- Durante o manuseio de reagentes ou amostras, vista roupa de segurança adequada (luvas, avental de laboratório e óculos de segurança apropriados), e lave as mãos após concluir a realização do teste.
- Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes estiverem sendo usados.
- A extração, a preparação da PCR e a execução da PCR devem ser separadas em salas diferentes para evitar contaminações cruzadas.
- As amostras devem ser tratadas como potencialmente infecciosas, bem como todos os reagentes e materiais expostos às amostras, devendo ser manuseados conforme os regulamentos nacionais de segurança.
- Não use o kit após o prazo de validade.
- Todos os reagentes e materiais usados devem ser descartados de modo adequado após o uso. Para o descarte, consulte as normas nacionais relevantes.

Para mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança (SDS) em www.r-biopharm.com

8. Coleta e armazenamento

8.1 Preparação das amostras a partir de amostras de fezes

Para o isolamento de RNA de amostras de fezes humanas, utilize um kit de extração de RNA disponível no mercado (p. ex., RIDA® Xtract (R-Biopharm)) ou sistema de extração RNA (p.ex. Maxwell® RSC (Promega)). Extraia o RNA viral de acordo com as instruções do fabricante.

Recomendamos a diluição das amostras de fezes em água 1:10 antes de realizar a extração. Agite em vórtice rapidamente e centrifugue a 13.000 x g durante 1 min. Use o volume apropriado a partir do sobrenadante de acordo com as instruções do fabricante.

O teste RIDA®GENE Sapovirus contém um **Internal Control RNA** que detecta a inibição de PCR, monitora a integridade do reagente e confirma que a extração do ácido nucleico foi suficiente. O **Internal Control RNA** pode ser utilizado como controle de inibição de PCR ou como controle de extração para o procedimento de preparação de amostra e como controle de inibição PCR.

Se o **Internal Control RNA** for usado apenas como controle de inibição de PCR, deve ser adicionado 1 µl de **Internal Control RNA** à mistura principal (consulte a Tab. 4).

Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, durante o procedimento de extração, devem ser adicionados 20 µl do **Internal Control RNA**. O **Internal Control RNA** deve sempre ser adicionado à mistura amostra-tampão de lise e **não** deve ser adicionado diretamente à amostra. Recomendamos também adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de PCR do Controle negativo e Controle positivo.

9. Execução do teste

9.1 Preparação da mistura principal

Calcule o número total de reações PCR (reações de amostra e de controle) necessárias. Em cada ensaio realizado, devem ser incluídos um controle positivo e um controle negativo.

É recomendado calcular um volume adicional de 10 % para compensar pipetagens imprecisas (ver Tab. 3. Tab. 4). Antes de usar, descongele, misture cuidadosamente e centrifuge brevemente a Reaction Mix, a Enzyme Mix, o Positive Control, o No Template Control e o Internal Control RNA. Mantenha os reagentes frios o suficiente durante a etapa (2 a 8 °C).

Tab. 3: Exemplo de cálculo e pipetagem para 10 reações do mistura principal (ICR como controle de extração e inibição de PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Total	20 µl	220 µl

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifuge brevemente.

Tab. 4: Exemplo de cálculo e pipetagem para 10 reações do mistura principal (ICR apenas como controle de inibição de PCR)

Código do kit	Componentes da mistura principal	Volume por reação	10 reações (10 % extra)
1	Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
2	Enzyme Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Total	21,0 µl	231,0 µl

Misture os componentes da mistura principal cuidadosamente e centrifuge brevemente.

9.2 Preparação da mistura RT-PCR

Pipete 20 µl da mistura principal em cada tubo de ensaio (tubo ou placa).

Controle negativo: Adicione 5 µl de **No Template Control** à mistura principal pré-pipetada.

Indicação: Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de PCR do controle negativo.

Amostras: Adicione 5 µl de extrato de RNA à mistura principal pré-pipetada.

Controle positivo: Adicione 5 µl do **Positive Control** à mistura principal pré-pipetada.

Indicação: Se o **Internal Control RNA** for usado como um controle de extração para o procedimento de preparação da amostra e como controle de inibição da PCR, recomendamos adicionar 1 µl do **Internal Control RNA** à mistura de RT-PCR do controle positivo.

Cubra os tubos ou a placa. Centrifugue e coloque no instrumento de PCR em tempo real. A reação de RT-PCR deve ser iniciada de acordo com as definições do instrumento de PCR (consulte Tab. 5. Tab. 6).

9.3 Configuração do instrumento de PCR

9.3.1 Perfil de RT-PCR em tempo real universal

Tab. 5: Perfil de RT-PCR em tempo real universal para LightCycler® series

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C	
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C	
Ciclos	45 ciclos	
<u>PCR</u>	Desnaturação Recozimento/Extensão	10 s, 95 °C 15 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo	

Indicação: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa.

Tab. 6: Perfil RT-PCR em tempo real universal para Mx3005P, ABI7500, Rotor-Gene Q e CFX96™

<u>Transcrição reversa</u>	10 min, 58 °C	
Desnaturação inicial	1 min, 95 °C	
Ciclos	45 ciclos	
<u>PCR</u>	Desnaturação Recozimento/Extensão	15 s, 95 °C 30 s, 60 °C
Índice da temperatura de transição / Índice de subida	Máximo	

Indicação: O recozimento e a extensão ocorrem na mesma etapa

Indicação: O perfil universal de PCR em tempo real também pode ser usado para ensaios de DNA se os ensaios de PCR em tempo real RIDA®GENE DNA e RIDA®GENE RNA forem combinados em uma única execução.

9.4 Configuração dos canais de detecção

Tab. 7: Seleção dos canais de detecção adequados

Instrumento de PCR em tempo real	Detecção	Canal de detecção	Indicação
Roche LightCycler® 2.0	Sapovírus	530	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) necessário
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovírus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessário
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovírus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessário
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovírus	FAM	Verifique se a opção de referência passiva ROX está em nenhum
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovírus	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas em 5
	ICR	Amarelo	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovírus	FAM	Verifique se existe corante de referência passivo
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovírus	FAM	-
	ICR	VIC	

10. Controle de qualidade

A análise das amostras é realizada pelo software do instrumento de PCR em tempo real usado, de acordo com as instruções do fabricante. Os controles positivo e negativo devem mostrar resultados corretos (veja a Tabela 8, Fig. 1) para poder determinar uma execução válida.

O Positive Control tem uma concentração de 10^3 cópias/ μl . Em cada execução da PCR, ele é usado em um valor total de 5×10^3 cópias.

Tab. 8: Para uma execução válida, é necessário preencher as seguintes condições:

Amostra	Resultado do ensaio	ICR Ct	Ct Alvo
Positive Control	Positivo	NA *1	Veja o Certificado de Garantia de Qualidade
Controle negativo	Negativo	Ct > 20	0

*1 Não é necessário um valor de Ct para o ICR para obter um resultado positivo do controle positivo.

Se o controle positivo não for positivo dentro do intervalo de Ct especificado, mas o Controle negativo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se o controle negativo não for negativo, mas o controle positivo for válido, prepare todas as reações incluindo os controles.

Se os critérios exigidos não forem preenchidos, os itens a seguir devem ser verificados antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade da instrumentação utilizada
- Desempenho correto de realização do teste

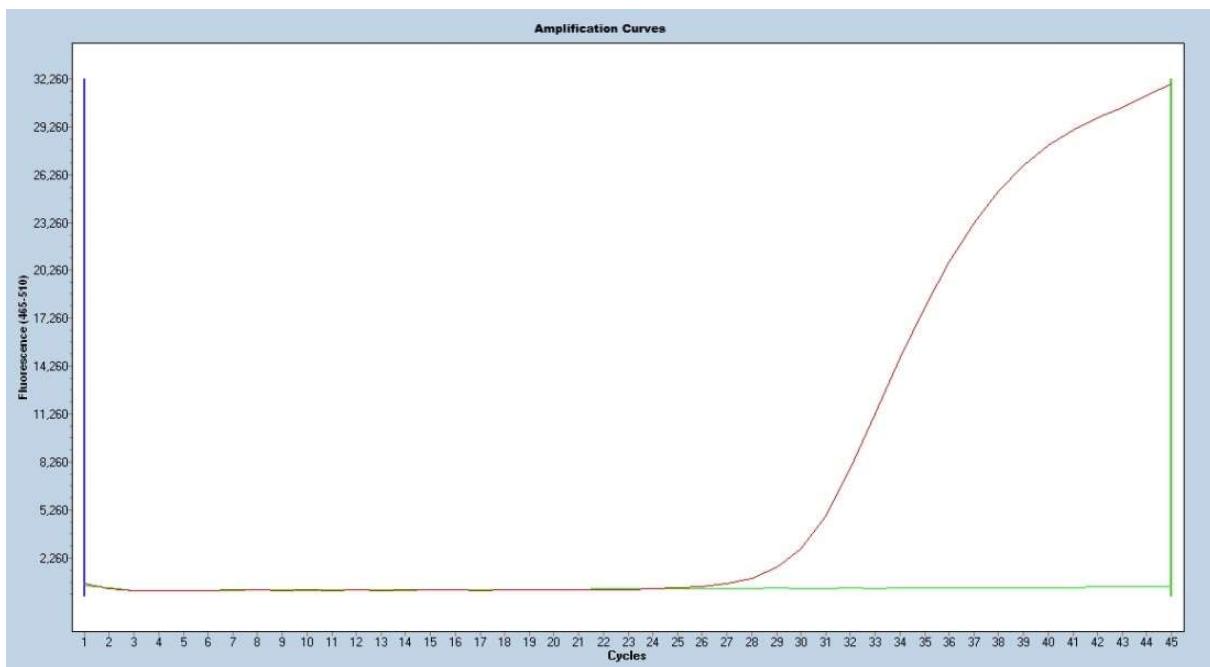


Fig.1: Execução correta do controle positivo e negativo (sapovírus) no LightCycler® 480II

11. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a Tabela 9.

Tab.9: Interpretação das amostras

Sapovírus	ICR	Resultado
positivo	positivo/negativo	Sapovírus detectado
negativo	positivo	Genes alvo não detectados
negativo	negativo	Inválido

O sapovírus é detectado se a amostra RNA e o Internal Control RNA apresentarem um sinal de amplificação no sistema de detecção.

O sapovírus também é detectado se a amostra de RNA apresentar um sinal de amplificação, mas nenhum no Internal Control RNA no sistema de detecção. A detecção do Internal Control RNA não é necessária, porque as altas concentrações do fragmento amplificado podem causar um sinal fraco ou ausente do Internal Control RNA.

O sapovírus não é detectado se a amostra de RNA não apresentar um sinal de amplificação, mas sim um sinal de amplificação no Internal Control RNA no sistema de detecção. A inibição da reação de PCR pode ser excluída através da detecção no Internal Control RNA.

Uma amostra é inválida, se a amostra de RNA e o Internal Control RNA não apresentarem nenhum sinal de amplificação no sistema de detecção. A amostra contém um inibidor de PCR. A amostra extraída precisa ser diluída adicionalmente com água PCR (1:10) e reamplificada, ou o isolamento e a purificação da amostra devem ser melhorados.

12. Limitações do método

1. O resultado da análise molecular não deve levar ao diagnóstico, mas sim ser sempre considerado no contexto do histórico médico e dos sintomas do paciente.
2. Este teste somente é validado para amostras de fezes.
3. A coleta, o transporte, o armazenamento e o processamento inadequados da amostra ou uma carga patogênica na amostra inferior à sensibilidade analítica podem resultar em resultados falso negativos.
4. A presença de inibidores de PCR pode causar resultados inválidos.
5. Mutações ou polimorfismos na primeira coleta ou regiões de ligação de sonda podem afetar a detecção de novas variantes, gerando um resultado falso negativo com o teste RIDA[®]GENE Sapovirus.
6. Do mesmo modo que em todos os testes de diagnóstico *in vitro* com base em PCR, é possível detectar os níveis de alvo extremamente baixos, inferiores ao limite de detecção (LoD), mas os resultados podem não ser reproduzíveis.
7. Um resultado positivo nos testes não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. No entanto, um resultado positivo indica a presença do gene alvo (ORF1).

13. Características de desempenho

13.1 Desempenho clínico

Em um estudo retrospectivo de validação clínica, analisamos 86 amostras de fezes humanas extraídas com o ensaio RIDA®GENE Sapovirus e um ensaio interno de PCR em tempo real em um instituto na França.

Tab.10: A correlação dos resultados do sapovírus com o RT-PCR RIDA®GENE Sapovirus multiplex em tempo real e a referência interna em tempo real PCR.

		PCR em tempo real interna			
		Positivo	Negativo	Total	
RIDA®GENE <i>Sapovirus</i>	Positivo	30	0	30	PPV: 100%
	Negativo	0	56	56	NPV: 100%
	Total	30	56	86	

13.2 Sensibilidade analítica

O PT-PCR em tempo real multiplex RIDA[®]GENE Sapovirus possui um limite de detecção de ≥ 50 cópias de RNA por reação por sapovírus.

A seguinte figura 2 mostra uma série de diluição do sapovírus (10^5 - 10^1 cópias de RNA por μl) no LightCycler[®] 480II.

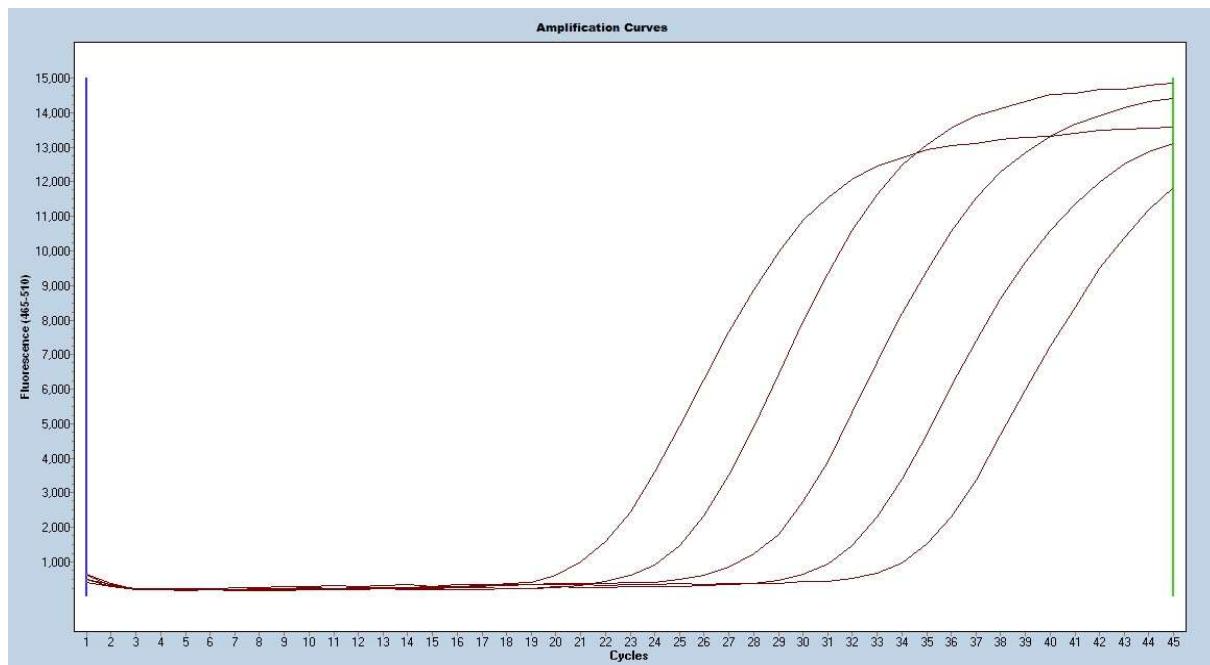


Fig. 2: Séries de diluição sapovírus (10^5 – 10^1 cópias de RNA por μl) no LightCycler[®] 480II

O limite de detecção de todo o procedimento depende da matriz da amostra, da extração de RNA e da concentração de RNA.

13.3 Especificidade analítica

A especificidade analítica do RT-PCR RIDA®GENE Sapovirus em tempo real multiplex é específica para sapovírus de amostras de fezes humanas. Não foi detectada nenhuma reação cruzada em relação às seguintes espécies (ver Tab. 11):

Tab. 11: Testes de reatividade cruzada

Adenovírus 1, humano, cepa Adenoid 71	-	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>lari</i>	-	<i>Cryptosporidium parvum</i>	-	Norovirus GG II	-
Adenovírus 7, humano, cepa Gomen	-	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	-	<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
Adenovirus 40, humano, cepa Dugan	-	<i>Candida albicans</i>	-	<i>E. coli</i> (O26:H-)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Adenovirus 41, humano, cepa Tak	-	<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>E. coli</i> (O6)	-	Rotavírus	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Clostridium bifementans</i>	-	<i>Entamoeba histolytica</i>	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Serratia liquefaciens</i>	-
Astrovírus	-	<i>Clostridium novyi</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>Giardia lamblia</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Clostridium septicum</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> Portland 1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter coli</i>	-	<i>Clostridium sordellii</i>	-	<i>Giardia intestinalis</i> WB Clone C6	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	<i>Cryptosporidium muris</i>	-	Norovirus GG I	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

14. Histórico de versões

Número da versão	Capítulo e designação
2018-06-11	Versão anterior
2021-02-01	Revisão geral 10. Controle de qualidade (erros ortográficos) 14. Histórico de versões 15. Explicação dos símbolos

15. Explicação dos símbolos

Símbolos gerais

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Respeitar as instruções de utilização
	Número de lote
	Válido até
	Temperatura de conservação
	Referência do produto
	Número de testes
	Data de fabricação
	Fabricante

Símbolos específicos do teste

Reaction Mix

Enzyme-Mix

Internal Control RNA

No Template Control

Positive Control

16. Literatura

1. Shigemoto N et al. Detection of *Norovirus*, *Sapovirus*, and human *Astrovirus* in fecal specimens using a multiplex reverse transcription-PCR with fluorescent dye-labeled primers. *Microbiol Immunol.* 2011, 55: 369-372.
3. Chiba S et al. Sapporo Virus: History and recent findings. *J. Infect. Dis.* 2000, 181(Suppl 2): S303-S308.
3. Johansson PJ et al. A nosocomial *Sapovirus*-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005, 37: 200-204.
4. Lee LE et al. *Sapovirus* outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. *Emerging Infect. Dis.* 2012, 18: 873-876.
5. Nakata S et al. Prevalence of human *Calicivirus* infections in Kenya determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36: 3160-3163.
6. Wolfaardt M et al. Incidence of human *Calicivirus* and *Rotavirus* infection in patients with gastroenteritis in South Africa.