

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 Norwalk (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 múltiple 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 múltiple 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)
- Centrífuga 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/ μ l. 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.

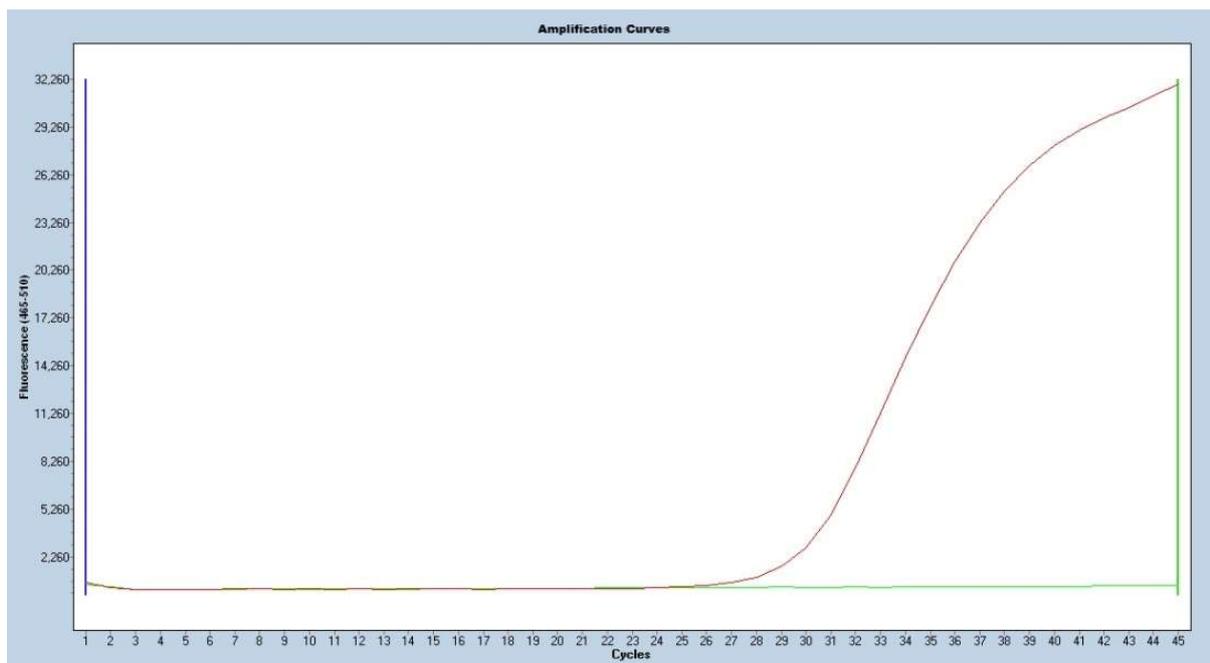


Fig.1: Procesamiento correcto del control positivo y del control negativo (Sapovirus) en el LightCycler® 480II

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.

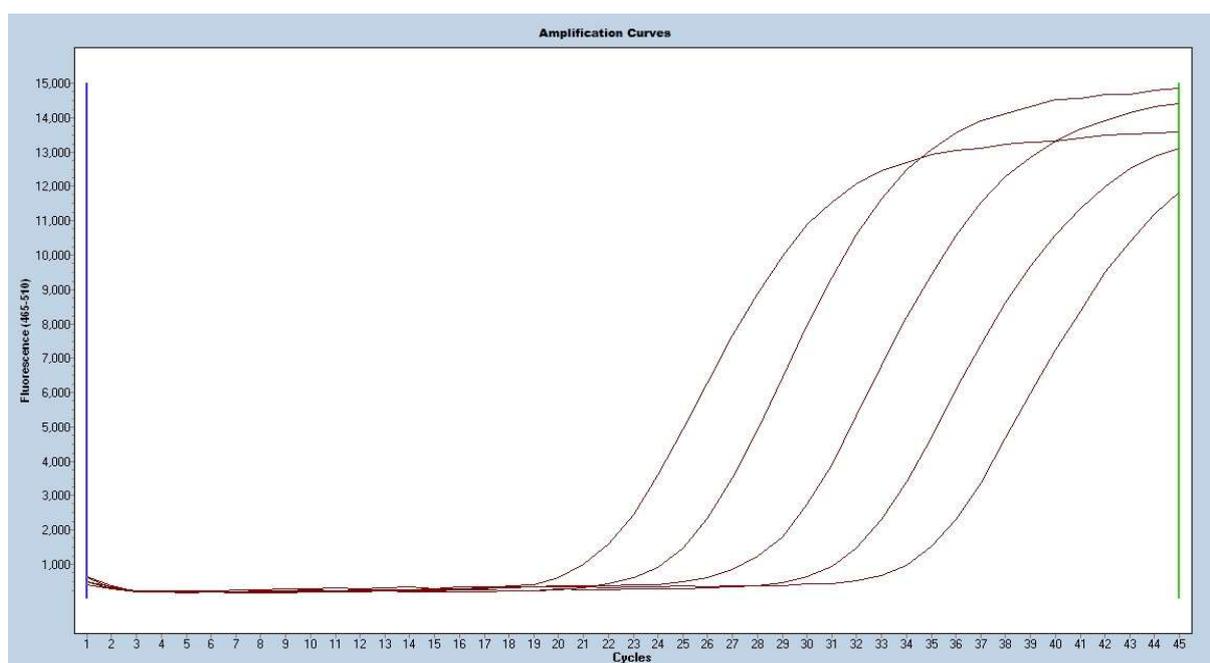


Fig. 2: Dilución seriada de Sapovirus (10^5 a 10^1 copias de ARN por μl) en el LightCycler® 480II

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.