

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 feci 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 feci 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.
- Scongellare 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/scongellamento 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 feci 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 feci 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/ μ l. 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

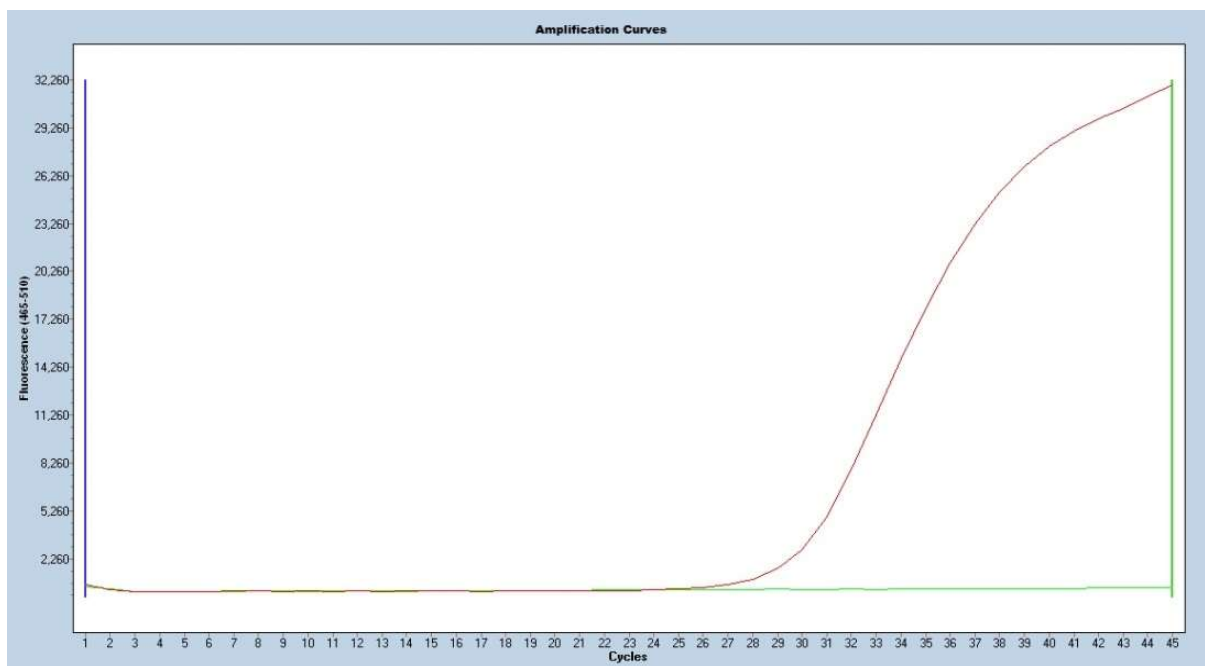


Fig.1: Esecuzione corretta del controllo positivo e negativo (Sapovirus) sul LightCycler® 480II

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

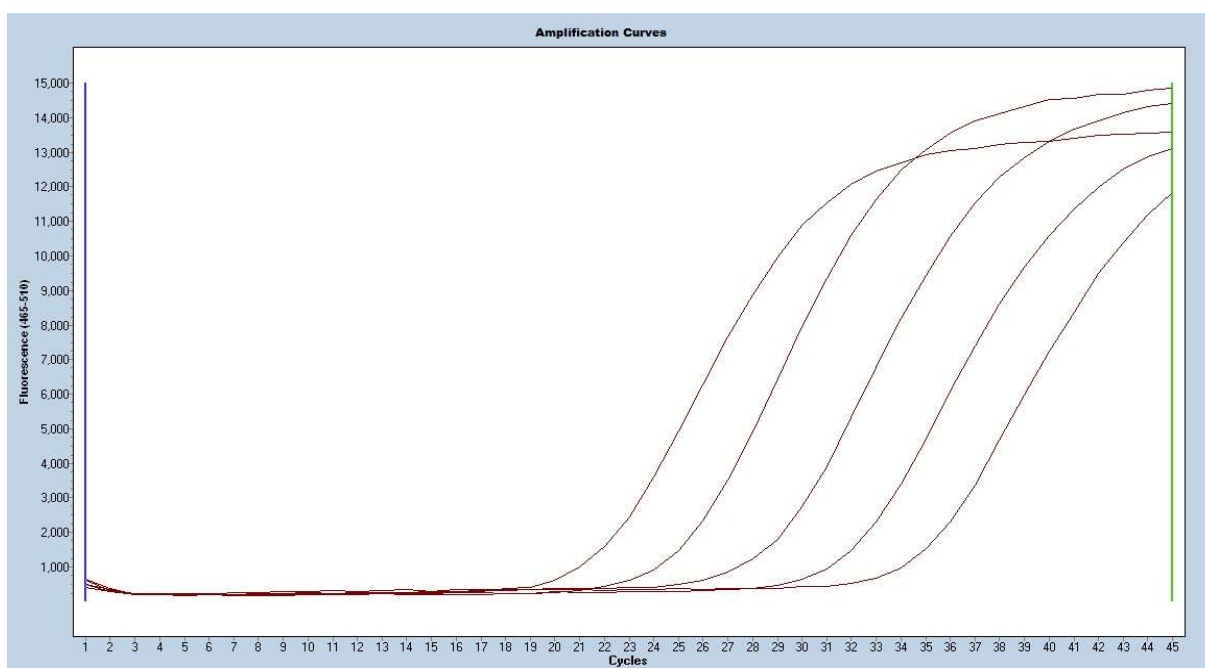


Fig. 2: Serie di diluizione di Sapovirus ($10^5 - 10^1$ copie di DNA per μl) sul LightCycler® 480II

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

	Diagnostica <i>in vitro</i>
	Leggere il foglio illustrativo
	Codice identificativo
	Utilizzabile fino a
	Temperatura di conservazione
	Numero articolo
	Quantità di test
	Data di produzione
	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.