

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 Norwalk (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 centrifugue 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 centrifugue 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 centrifugue 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	10 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	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	15 s, 95 °C
Recozimento/Extensão	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	Deteção	Canal de deteção	Indicação
Roche LightCycler® 2.0	Sapovirus	530	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) necessário
	ICR	560	
Roche LightCycler® 480II	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessário
	ICR	533/580	
Roche LightCycler® 480 z	Sapovirus	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004) necessário
	ICR	540/580	
ABI 7500	Sapovirus	FAM	Verifique se a opção de referência passiva ROX está em nenhum
	ICR	VIC	
Qiagen Rotor-Gene Q	Sapovirus	Verde	As configurações de ganho devem ser definidas em 5
	ICR	Amarelo	
Agilent Techn. Mx3005P	Sapovirus	FAM	Verifique se existe corante de referência passivo
	ICR	HEX	
Bio-Rad CFX96™	Sapovirus	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/ μ l. 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

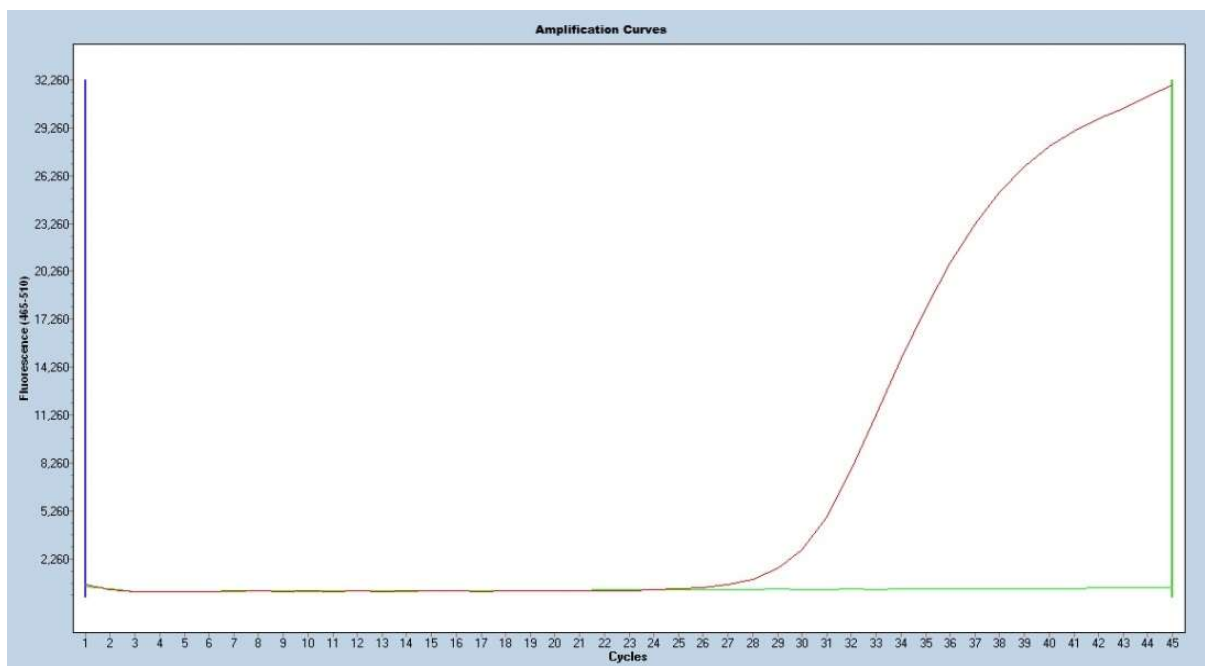


Fig.1: Execução correta do controle positivo e negativo (sapovírus) no LightCycler® 480II

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.

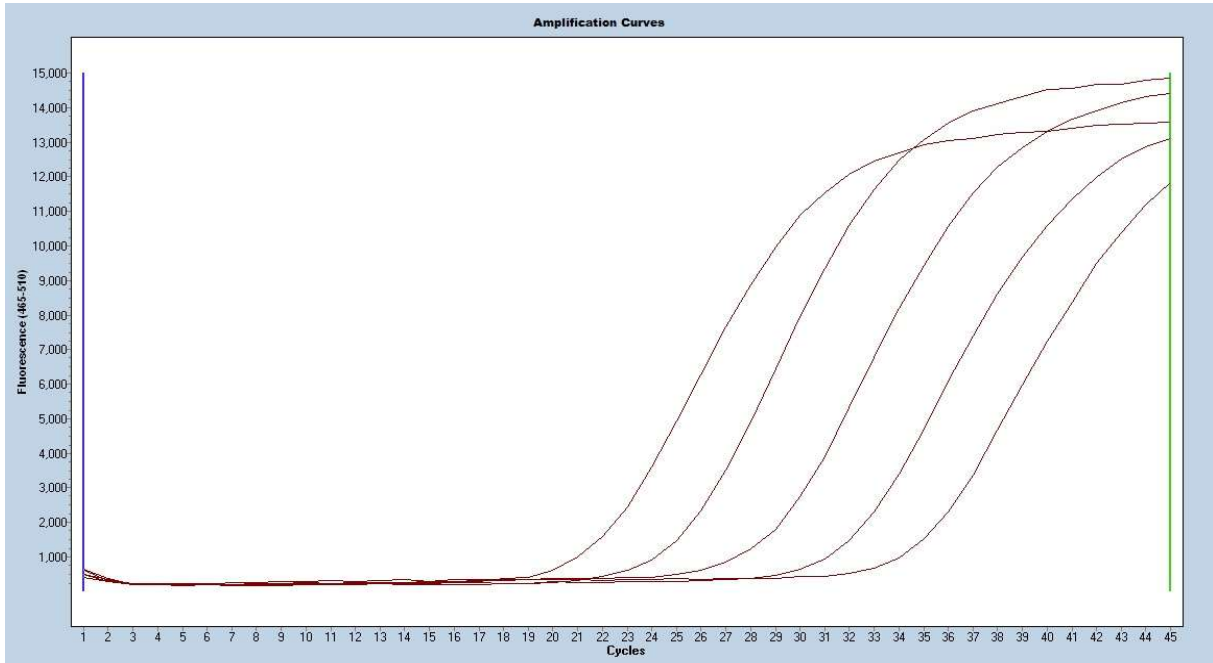


Fig. 2: Séries de diluição sapovírus ($10^5 - 10^1$ cópias de RNA por μl) no LightCycler® 480II

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 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>	-
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.
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.