REAL TIME PCR

DETECTION KIT

Sapovirus

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	**VS-SAV106L**
VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	**VS-SAV106H**
VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	**VS-SAV112L**
VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	**VS-SAV112H**
VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	**VS-SAV113L**
VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	**VS-SAV113H**

For information purposes only

VIASURE

ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification of Sapovirus in human stool samples from patients with signs and symptoms of gastrointestinal infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of Sapovirus in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probe specific for Sapovirus.

2. Summary and Explanation

Sapoviruses (SaVs), formerly called "Sapporo-like viruses," belong to the family *Caliciviridae* and cause acute gastroenteritis in humans and swine. Sapovirus was first detected in 1977, as the cause of a gastroenteritis outbreak in a home for infants in Sapporo, Japan, and since then, 15 genotypes in four genogroups (GI.1 to GI.8, GII.1 to GII.5, GIV, and GV) have been described in humans.

SaV is considered an important cause of gastroenteritis in children under 5 years of age, while it is of minor importance in adults. The clinical symptoms of sapovirus infection are thought to be milder than symptoms of norovirus infections, which include mild and/or acute watery diarrhea, stomach cramps, nausea, vomiting and occasionally fever. SaVs can be transmitted via the fecal-oral route through water and contaminated foods, as well as through person-to-person contact.

The SaV genome is a single-stranded positive-sense RNA molecule of approximately 7.5 kb with two to three open reading frames (ORFs). The ORF1 encodes non-structural proteins (including RNA-dependent RNA polymerase) and capsid protein (VP1), while ORF2 encodes a minor structural protein and ORF3 encode proteins of unknown functions. Real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR) targeting polymerase-capsid junction is currently widely used assay for the detection of SaVs in clinical and environmental samples.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of gastroenteritis caused by Sapovirus in human stool samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of ORF1 using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit is based on 5´ exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on real time PCR platforms.

For information purposes only

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Sapovirus RNA targets are amplified and detected in FAM channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel.

4. Reagents provided

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-SAV1SL/ VS-SAV1SH	*Sapovirus* 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-SAV1C	*Sapovirus* Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-SAV106L, VS-SAV106H, VS-SAV112L and VS-SAV112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-SAV1PL/ VS-SAV1PH	*Sapovirus* 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-SAV1C	*Sapovirus* Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-SAV113L and VS-SAV113H.

For information purposes only

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using but not included in the VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposal gloves.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40ºC until expiration date stated in the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious as well as all reagents and materials that have been exposed to the samples and must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

8. Test procedure

8.1. SAMPLE PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. We recommend to use fresh samples.

For information purposes only

For longer storage, the samples must be frozen at -20ºC. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Homogenise stool sample as thoroughly as possible prior to preparation. Freezing and thawing cycles are not recommended.

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used.

8.1.1. RNA EXTRACTION

For RNA extraction from human stool samples you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer´s instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- UltraClean® Tissue & Cells RNA Isolation Kit (Mobio).
- NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).
- RIDA® Xtract (R-biopharm).
- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- NucliSENS® EasyMAG™ platform (bioMérieux).

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

Sapovirus positive Control contains high copies template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Sapovirus* positive Control (red vial) adding 100 µL of Water RNAse/DNAse free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20ºC. We recommend to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR PROTOCOL

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run. Peel off protective aluminum seal from plates or strips.

1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted *Sapovirus* positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

For information purposes only

3) Set up your thermocycler.

Program your thermocycler following the conditions below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Reverse transcription	15 min	45ºC
1	Initial denaturalization	2 min	95ºC
45	Denaturation	10 seg	95ºC
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60ºC

Table 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Sapovirus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for *Sapovirus* positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer´s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

Sapovirus	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	**Sapovirus Positive**
-	+	-	+	**Sapovirus Negative**
+	+	+	+	**Experiment fail**
-	-	-	-	**Experiment fail**

Table 4. Sample interpretation

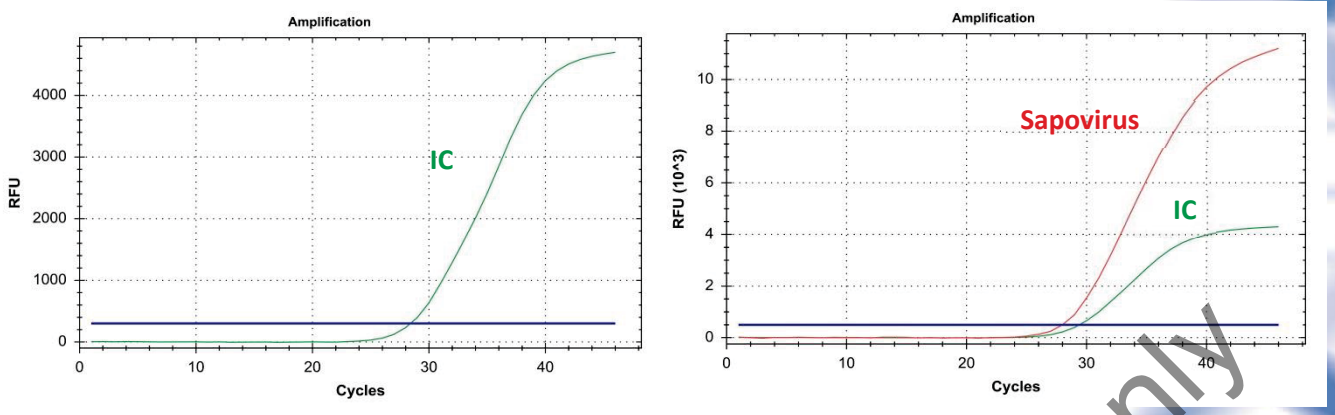
+: Amplification curve
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

For information purposes only

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



Negative control

Positive control

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

10. Limitations of the test

- The result of the test should be evaluated by a health care professional and evaluated in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with human faecal samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from faecal specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Sapovirus, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

For information purposes only

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The clinical performance of VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit was tested using 87 faecal samples from symptomatic patients.. These results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RIDA®GENE Sapovirus (r-Biopharm)).

The results were as follows:

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Sapovirus (r-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	19	0	19
	-	0	68	68
	Total	19	68	87

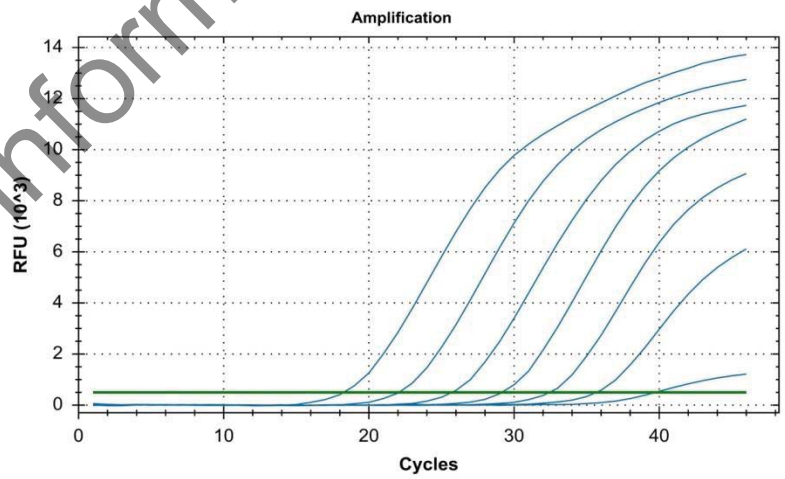
Table 5. Comparative results

The results show a high sensitivity and specificity to detect Sapovirus using VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥10 viral RNA copies per reaction (Figure 2)

Figure 2. Dilution series of Sapovirus (10^7-10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the Sapovirus assay was confirmed by testing a panel consisting of 45 microorganisms representing the most common enteric pathogens or flora present in the intestine. No cross reactivity was detected against any of the following microorganisms tested.

For information purposes only

Cross-reactivity testing					
Helicobacter pylori	-	*Campylobacter lari*	-	*Klebsiella oxytoca*	-
Helicobacter hepaticus	-	*Campylobacter fetus*	-	*Listeria monocytogenes*	-
Helicobacter cinaedi	-	*Campylobacter coli*	-	*Candida albicans*	-
Helicobacter heilmannii	-	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	-	*Arcobacter butzleri*	-
Shigella flexneri	-	*Campylobacter upsaliensis*	-	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Shigella dysenteriae	-	*Proteus vulgaris*	-	*Enterococcus faecalis*	-
Salmonella typhi	-	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila*	-	*Bacteroides fragilis*	-
Salmonella paratyphi A	-	*Citrobacter freundii*	-	*Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9	-
Salmonella paratyphi B	-	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-	*Cryptosporidium parvum*	-
Salmonella typhimurium	-	*Serratia liquefaciens*	-	*Giardia intestinalis*	-
Salmonella bongori	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-	*Entamoeba histolytica*	-
Salmonella enteritidis	-	*Clostridium difficile*	-	Adenovirus serotypes 40/41	-
Salmonella enterica subsp. entérica	-	*Clostridium perfringens*	-	Rotavirus A	-
Salmonella pullorum	-	*Enterotoxigenic Escherichia coli*	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
Salmonella gallinarum	-	*Enteropathogenic Escherichia coli*	-	Norovirus GI and GII	-

Table 6. Reference pathogenic and non-pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against Sapovirus genotypes GI.1, GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3 and OH8021/2008/JP-like (putative GI.5) showing positive results.

For information purposes only

ANNEX 1:

COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with low profile block, like systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with high or regular profile block, like systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS

Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS

Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.

** The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.*

For information purposes only

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica de Sapovirus en muestras de heces humanas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección gastrointestinal. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por Sapovirus en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de las muestras fecales, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher)* para detectar Sapovirus.

2. Introducción y explicación

Los Sapovirus (SaV), anteriormente conocidos como "virus Sapporo-like," pertenecen a la familia *Caliciviridae* y causan gastroenteritis aguda en humanos y ganado porcino. Estos virus fueron detectados por primera vez en 1977, como causa de un brote de gastroenteritis en un orfanato en Sapporo (Japón), y desde entonces, se han descrito 15 genotipos agrupados en cuatro genogrupos (GI.1 a GI.8, GII.1 a GII.5, GIV, y GV) como causantes de infección en seres humanos. SaV se considera una causa importante de gastroenteritis en niños menores de 5 años de edad, mientras que en los adultos su importancia es menor. Los síntomas clínicos de infección por sapovirus se cree que son más leves que los síntomas asociados con norovirus, que incluyen diarrea acuosa leve o aguda, calambres en el estómago, náuseas, vómitos y ocasionalmente fiebre. SaVs se pueden transmitir a través de la vía fecal-oral a partir de agua y alimentos contaminados, así como por contacto de persona a persona.

El genoma SaV consiste en un RNA monocatenario de sentido positivo (ssRNA+) de 7.5-kb que contiene de dos a tres *open reading frames* (ORFs). El ORF1 codifica para las proteínas no estructurales (incluyendo la RNA-polimerasa dependiente de RNA) y para la proteína mayoritaria de la cápside (VP1). El ORF2 codifica para una proteína estructural minoritaria y el ORF3 para una proteína de función todavía desconocida. Actualmente, los ensayos basados en RT-PCR a Tiempo Real más utilizados van dirigidos a detectar la región situada en el extremo 3' de la región codificante para la RNA polimerasa dependiente de RNA, ya que es una de las regiones más conservadas en el genoma de SaV.

3. Procedimiento

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de gastroenteritis causada por Sapovirus en muestras de heces humanas. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de Sapovirus se lleva a cabo mediante

For information purposes only

la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de la región genómica ORF1.

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5´ exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, Sapovirus se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-SAV1SL/ VS-SAV1SH	*Sapovirus* 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-SAV1C	*Sapovirus positive* Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SAV106L, VS-SAV106H, VS-SAV112L, VS-SAV112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-SAV1PL/ VS-SAV1PH	*Sapovirus* 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-SAV1C	*Sapovirus positive* Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-SAV113L y VS-SAV113H.

For information purposes only

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I)
- Kit de extracción de RNA
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40ºC hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

For information purposes only

8. Procedimiento del test

8.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios y deben ser procesadas con la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda el uso de muestras frescas.

Para conservar durante un tiempo prolongado, las muestras pueden congelarse a -20ºC. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente antes de realizar el ensayo. No se recomiendan ciclos de congelación y descongelación. Homogenizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

8.1.1. EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA a partir de muestras de heces humanas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante, si bien, los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- UltraClean® Tissue & Cells RNA Isolation Kit (Mobio).
- NucleoSpin® RNA Virus (Machery Nagel).
- RIDA® Xtract (R-biopharm).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- NucliSENS® EasyMAG™, sistema de extracción automatizado (bioMérieux).

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

El vial de *Sapovirus* positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Sapovirus* positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20ºC tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

For information purposes only

8.3. PROTOCOLO PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) **Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.**

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) **Añadir muestras y controles.**

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Sapovirus* positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) **Configurar el termociclador.**

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45ºC
1	Desnaturalización inicial	2 min	95ºC
45	Desnaturalización	10 seg	95ºC
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60ºC

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (Sapovirus) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de Sapovirus. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

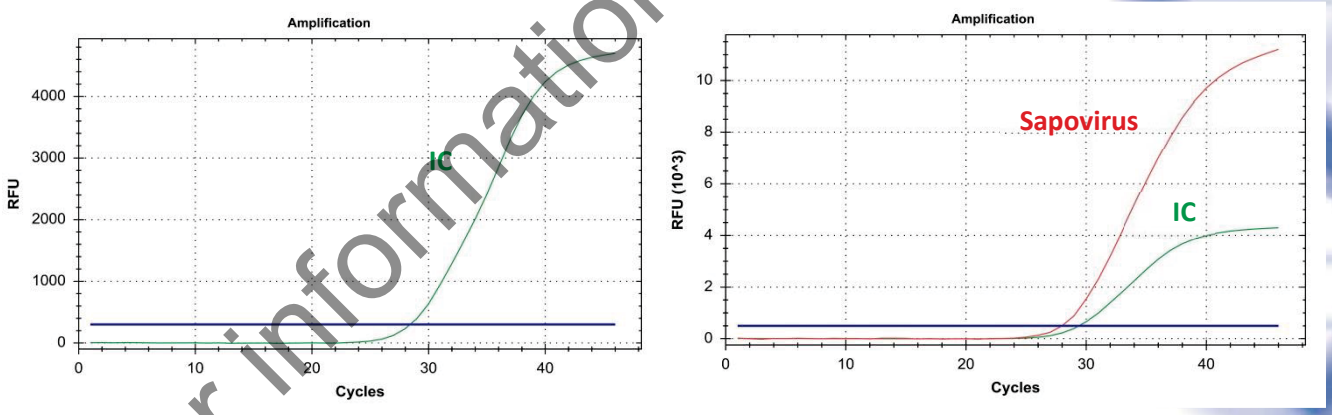
For information purposes only

Sapovirus	Control interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Sapovirus Positivo
-	+	-	+	Sapovirus Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



Control Negativo

Control Positivo

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

10. Limitaciones del test

For information purposes only

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con muestras fecales humanas.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras fecales humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con Sapovirus, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLÍNICA

Se evaluaron 87 muestras de pacientes sintomáticos utilizando VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit. Estos resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RIDA®GENE Sapovirus (r-Biopharm)).

Los resultados fueron los siguientes:

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit	RIDA®GENE Sapovirus (r-Biopharm)			
		+	-	Total
	+	19	0	19
	-	0	68	68
	Total	19	68	87

Tabla 5. Comparativa de resultados

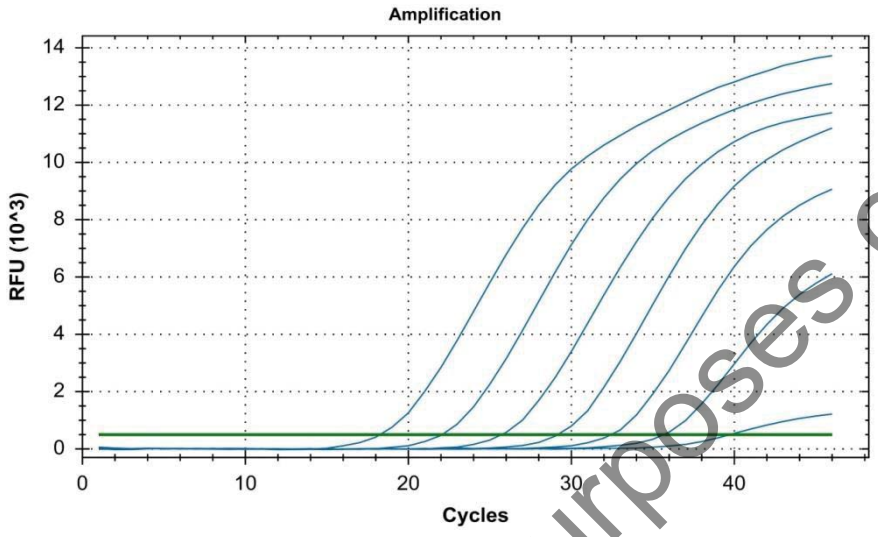
Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Sapovirus utilizando VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit.

For information purposes only

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥10 copias de RNA viral por reacción (Figura 2).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de Sapovirus (10^7-10^1copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de Sapovirus fue confirmada probando un panel compuesto por 45 microorganismos que representan los patógenos entéricos más comunes o que pueden estar presentes en la flora intestinal.

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit no identifica las siguientes cepas, por lo que no se generan falsos positivos, confirmándose así la exclusividad del ensayo.

Prueba de reacción cruzada					
Helicobacter pylori	-	*Campylobacter lari*	-	*Klebsiella oxytoca*	-
Helicobacter hepaticus	-	*Campylobacter fetus*	-	*Listeria monocytogenes*	-
Helicobacter cinaedi	-	*Campylobacter coli*	-	*Candida albicans*	-
Helicobacter heilmannii	-	*Campylobacter jejuni subsp. jejuni*	-	*Arcobacter butzleri*	-
Shigella flexneri	-	*Campylobacter upsaliensis*	-	*Pseudomonas aeruginosa*	-
Shigella dysenteriae	-	*Proteus vulgaris*	-	*Enterococcus faecalis*	-
Salmonella typhi	-	*Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila*	-	*Bacteroides fragilis*	-
Salmonella paratyphi A	-	*Citrobacter freundii*	-	*Yersinia enterocolitica* O:3 and O:9	-
Salmonella paratyphi B	-	*Staphylococcus aureus subsp. aureus*	-	*Cryptosporidium parvum*	-
Salmonella typhimurium	-	*Serratia liquefaciens*	-	*Giardia intestinalis*	-
Salmonella bongori	-	*Vibrio parahaemolyticus*	-	*Entamoeba histolytica*	-
Salmonella enteritidis	-	*Clostridium difficile*	-	Adenovirus serotypes 40/41	-
Salmonella enterica subsp. entérica	-	*Clostridium perfringens*	-	Rotavirus A	-
Salmonella pullorum	-	*Enterotoxigenic Escherichia coli*	-	Astrovirus Genotype I-VIII	-
Salmonella gallinarum	-	*Enteropathogenic Escherichia coli*	-	Norovirus GI and GII	-

Tabla 6. Microorganismos patógenos y no patógenos de referencia utilizados en este estudio.

For information purposes only

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a los genotipos GI.1, GI.2, GI.3, GII.1, GII.2, GII.3 y OH8021/2008/JP-like (GI.5 putativo) de Sapovirus, mostrando resultados positivos.

13. Bibliography/Bibliografía

1. M. Okada *et al.* The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. *Archives of Virology* 2006; 151(12): 2503-2509.

2. T. Oka *et al.* Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 2006; 78(10): 1347-1353.

3. M. Kitajima *et al*. Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76(8): 2461-2467.

4. C. Logan *et al.* Real-time reverse transcription PCR detection of norovirus, sapovirus and astrovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis. *Journal of Virological Methods* 2007; 146(1-2): 36-44.

5. F. Rovida *et al.* Molecular detection of gastrointestinal viral infections in hospitalized patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 77(3): 231-235.

6. D. Sano *et al.* Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77(3): 1111-1114.

7. P.J. Johansson. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2005; 37(3): 200-204.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico *in vitro*

IVD	*In vitro* diagnostic device Producto para diagnóstico *in vitro*		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante	LOT	Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura	Σ	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL	Sample diluent Diluyente de muestra	REF	Catalogue number Número de referencia

For information purposes only

ANEXO 1:

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	**Modelo**
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler ®480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler ®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	**Modelo**
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep *realplex*
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®*

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.

* El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

For information purposes only

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, AriaMx Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Sapovirus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, AriaMx Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

For information purposes only

- CFX ™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene® Q is a trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a trademark of Cepheid.

CERTEST BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

www.certest.es CE

For information purposes only