

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Zika, Dengue & Chikungunya

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

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-ZDC106L
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-ZDC106H
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-ZDC112L
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-ZDC112H
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-ZDC113L
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-ZDC113H
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-ZDC136
VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-ZDC172



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific detection and differentiation of Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses in clinical samples from patients with signs and symptoms of Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Zika, Dengue and Chikungunya viruses.

2. Summary and Explanation

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) are arthropod-borne viruses (arboviruses) that share mosquitos of the *Aedes* genus as common vector, specifically *A. aegypti* and *A. albopictus*. Environmental changes, urbanization and the globalization of travel have enhanced the spread of ZIKV, DENV and CHIKV resulting in epidemics and the co-circulation in overlapping geographic areas as well as the possibility of viral co-infection within a single host. Currently the major endemic regions include Africa, Southeast Asia, the Pacific Islands and the Americas.

Besides, these arboviruses cause similar clinical presentations, especially in the initial stages of infection (fever, headache, skin rash, muscle and joint pain, and gastrointestinal symptoms). In fact, due to neither virus possesses any specific distinguishing clinical features and the outcomes and management strategies for these three viruses are vastly different, an early and accurate diagnosis is imperative.

Therefore, ZIKV, DENV and CHIKV must be initially included in the differential diagnosis for a patient with suspicious clinical symptoms who is living in or returning from travel to an endemic area. Laboratory diagnostic tests are based on the detection of the virus, viral components (antigens or nucleic acid), or the host immunologic response to the virus. However, due to the cross-reactivity of the antibodies of these arboviruses limits the use of serology, Real Time RT-PCR is a detection method commonly used during the acute phase of the infection. In order to do that, clinical specimens that can be tested including blood, serum, plasma, urine and others.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses in clinical 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 the envelope gene (ZIKV), 3' Non coding region (DENV) and NSP1 gene (CHIKV), using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* 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.

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* 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. *Zika* virus RNA targets are amplified and detected in Cy5 channel, *Dengue* Virus RNA targets are amplified and detected in FAM channel, *Chikungunya* virus RNA targets are amplified and detected in ROX channel and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1, 2 and 3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices (See Annex 1). Table 3 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPS and stabilizers in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ZDC106L, VS-ZDC106H, VS-ZDC112L and VS-ZDC112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPS, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ZDC113L and VS-ZDC113H.



Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	Transparent	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 4-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ZDC136 and VS-ZDC172. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with and Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DPrime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. 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).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.



- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is intended for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-ZDC113L, VS-ZDC113H, VS-ZDC136 and VS-ZDC172). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-ZDC136 and VS-ZDC172 (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- 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 disposable 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 the reagents and materials that have been exposed to the samples and they 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.
- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. RNA extraction

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



For RNA extraction from clinical samples (blood, serum, plasma, urine, tissues and others) 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.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

8.2. Lyophilized positive control

Zika, Dengue & Chikungunya Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Zika, Dengue & Chikungunya* Positive Control (red vial) by adding 100 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it 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 for each assay. Peel off protective aluminium 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

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



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

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the Cy5 (Zika virus), FAM (Dengue virus), ROX (Chikungunya virus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Zika*, *Dengue* & *Chikungunya* in the 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 of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

Using the following table read and analyze the results:



Zika Virus (Cy5)	Dengue Virus (FAM)	Chikungunya Virus (ROX)	Internal control (HEX)	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Zika , Dengue and Chikungunya viruses Positive
-	-	-	+	-	+	Zika, Dengue and Chikungunya viruses Negative
+	-	-	+/-	-	+	Zika Virus Positive, Dengue and Chikungunya Viruses Negative
+	+	-	+/-	-	+	Zika and Dengue Viruses Positive, and Chikungunya Virus Negative
+	-	+	+/-	-	+	Zika and Chikungunya Viruses Positive, and Dengue Virus Negative
-	+	-	+/-	-	+	Dengue Virus Positive, Zika and Chikungunya Viruses Negative
-	+	+	+/-	-	+	Dengue and Chikungunya Viruses Positive, Zika Virus Negative
-	-	+	+/-	-	+	Chikungunya Virus Positive, Zika and Dengue Viruses Negative
+	+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	-	Experiment fail

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

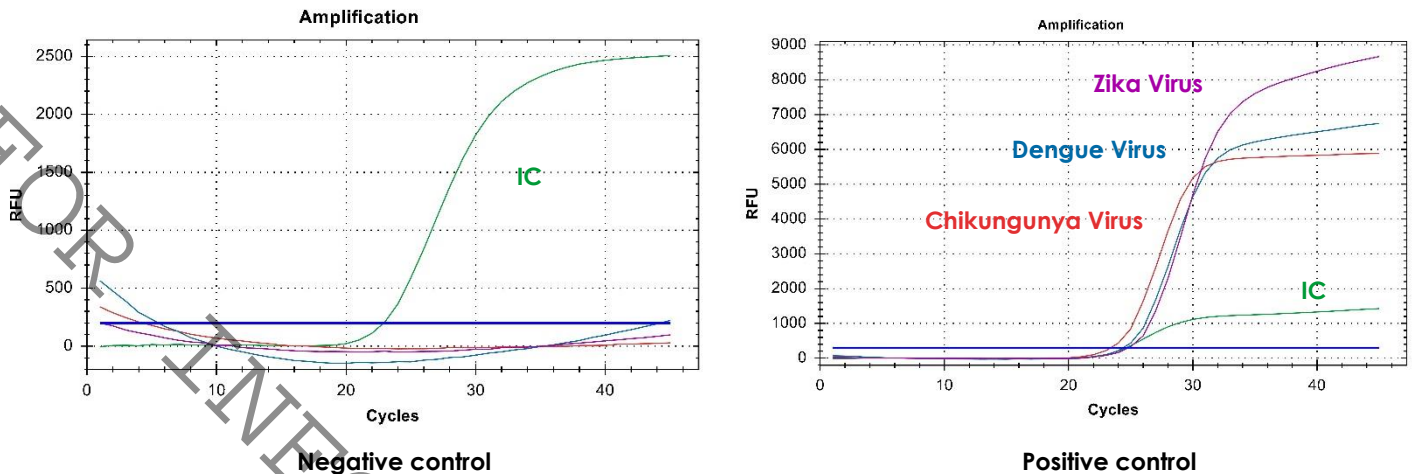
-: No amplification curve

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.



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



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.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional 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 RNA extracted from serum and urine samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples 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 might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *Zika*, *Dengue* and/or *Chikungunya* viruses either by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.



11. Quality control

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* 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.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with samples from INSTAND and QCMD programs. The clinical performance of VIASURE assay was tested using 102 clinical specimens. The results were compared with the final EQA Reports:

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit	EQA Reports			Total
		+	-	
+	25	0	25	
-	1	76	77	
Total	26	76	102	

Table 6. Comparative results for Zika Virus

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit	EQA Reports			Total
		+	-	
+	27	0	27	
-	3	72	75	
Total	30	72	102	

Table 7. Comparative results for Dengue Virus

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit	EQA Reports			Total
		+	-	
+	29	1	30	
-	2	70	72	
Total	31	71	102	

Table 8. Comparative results for Chikungunya Virus

The results show a high sensitivity and specificity to detect Zika, Dengue and Chikungunya viruses using VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit.



12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for ZIKV, DENV and CHIKV (Figure 2, 3 and 4).

Figure 2. Dilution series of Zika Virus (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel Cy5).

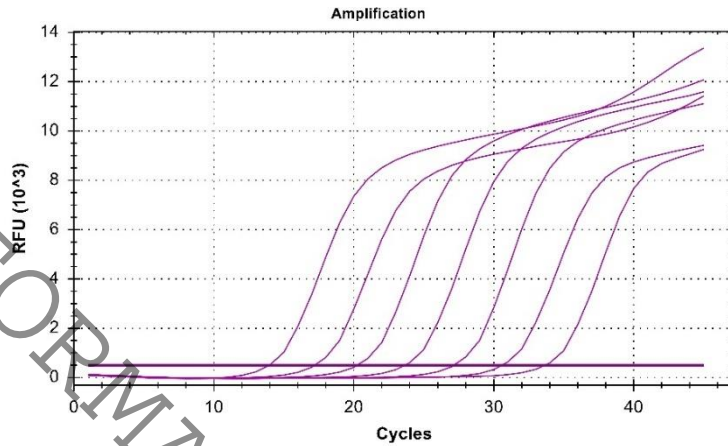


Figure 3. Dilution series of Dengue Virus (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

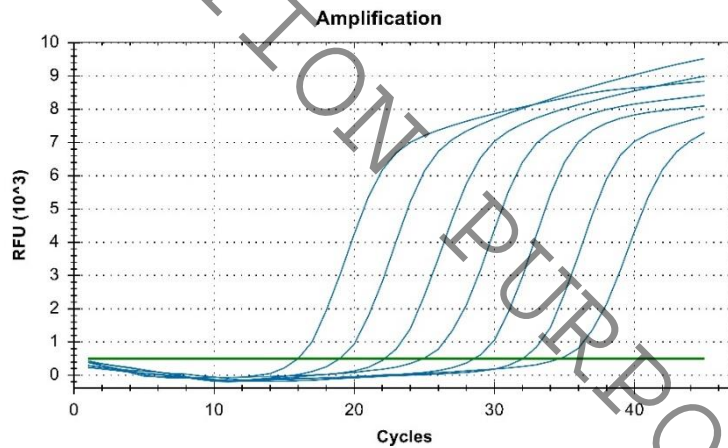
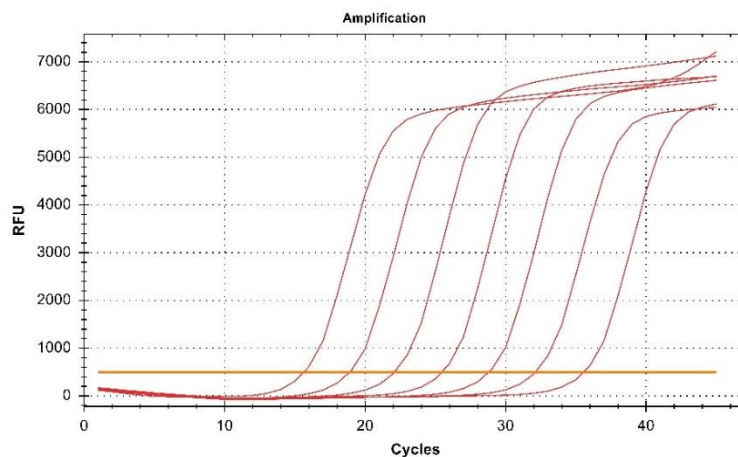


Figure 4. Dilution series of Chikungunya Virus (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the Zika, Dengue and Chikungunya viruses assays were confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common arbovirus.

No cross-reactivity of Zika Virus was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	West Nile virus strain H160/99	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	West Nile virus Heja	-
Dengue 3 virus strain H87	-	West Nile virus Ug37	-
Dengue 4 virus strain H241	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
Plasmodium falciparum	-	Trypanosoma cruzi	-
Japanese encephalitis	-		

Table 9. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

No cross-reactivity of Dengue Virus was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Zika virus strain MR 766 (Uganda)	-	West Nile virus strain H160/99	-
Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia)	-	West Nile virus Heja	-
Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia)	-	West Nile virus Ug37	-
Zika Virus (African)	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian)	-	Plasmodium falciparum	-
Trypanosoma cruzi	-	Japanese encephalitis	-

Table 10. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

No cross-reactivity of Chikungunya Virus was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Zika virus strain MR 766 (Uganda)	-	Dengue 3 virus strain H87	-
Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia)	-	Dengue 4 virus strain H241	-
Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia)	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Zika Virus (African)	-	West Nile virus strain H160/99	-
Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian)	-	West Nile virus Heja	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	West Nile virus Ug37	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
Plasmodium falciparum	-	Trypanosoma cruzi	-
Japanese encephalitis	-		

Table 11. Reference pathogenic microorganisms used in this study.



12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit for Zika Virus was evaluated against Zika virus strain MR 766 (Uganda, 1947), Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia), Zika Virus strain 11468/16 (French Polynesia), Zika Virus (African) and Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian) showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit for Dengue Virus was evaluated against Dengue 1 virus strain Hawaii, Dengue 2 virus strain New Guinea C, Dengue 3 virus strain H87 and Dengue 4 virus strain H241 showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit for Chikungunya was evaluated against Chikungunya virus S27 Petersfield (African genotype), and Chikungunya virus Martinique isolate (Asian genotype) showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the 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
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
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 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
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 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD 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 ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

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



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de las muestras clínicas, 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 sondas marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los virus Zika, Dengue y Chikungunya.

2. Introducción y explicación

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV) son virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que tienen como vector común los mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, específicamente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. La diseminación de estos virus se ve favorecida por el cambio climático, la urbanización y la globalización, provocando epidemias, cocirculación en las mismas áreas geográficas, así como la posibilidad de co-infección viral dentro de un único huésped. Actualmente las principales regiones endémicas son África, el sudeste de Asia, las islas del Pacífico y Centro-Sur América.

Además, estos arbovirus causan cuadros clínicos similares, especialmente en las etapas iniciales de la infección (fiebre, dolor de cabeza, erupciones en la piel, dolor muscular y articular y síntomas gastrointestinales). Un diagnóstico precoz y preciso es imprescindible debido a que comparten el mismo cuadro clínico y el manejo de la infección es diferente para cada uno de ellos.

Por lo tanto, es importante realizar un diagnóstico diferencial para ZIKV, DENV y CHIKV en un paciente con síntomas clínicos sospechosos que viva o que haya viajado a un área endémica. Las pruebas de diagnóstico se basan en la detección del virus, componentes virales (antígenos o ácido nucleico), o en la detección de la respuesta inmunológica del huésped al virus. Sin embargo, la Serología tiene un uso limitado, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos a estos arbovirus. La RT-PCR a tiempo real en cambio es un método de detección útil durante la fase aguda de la infección en muestras clínicas incluyendo sangre, suero, plasma, orina y otros.

3. Procedimiento

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya en muestras clínicas. 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 los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos



específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *envelope* (ZIKV), con la región 3' no codificante (DENV) y con el gen *NSP1* (CHIKV).

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* 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) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, el virus Zika se detecta en el canal Cy5, el virus Dengue se detecta en el canal FAM, el virus Chikungunya se detecta en el canal ROX y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> 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
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ZDC106L, VS-ZDC106H, VS-ZDC112L y VS-ZDC112H.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 filas de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ZDC113L y VS-ZDC113H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ZDC136 y VS-ZDC172. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL, y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).



VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. 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).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenamiento de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-ZDC113L, VS-ZDC113H, VS-ZDC136 y VS-ZDC172). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para referencias VS-ZDC136 y VS-ZDC172 (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.



- 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.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de RNA

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

Para la extracción de RNA a partir muestras de clínicas (sangre, suero, plasma, orina, tejidos y otros), 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. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Zika, Dengue & Chikungunya* 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* 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 -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.



8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos 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 Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Zika*, *Dengue* & *Chikungunya* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

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

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

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*), a través de los canales Cy5 (Virus Zika), FAM (Virus Dengue), ROX (Virus Chikungunya) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

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 *Zika*, *Dengue* & *Chikungunya*. 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:

Zika Virus	Dengue Virus	Chikungunya Virus	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Virus Zika, Dengue y Chikungunya Positivos
-	-	-	+	-	+	Virus Zika, Dengue y Chikungunya Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Virus Zika Positivo, Virus Dengue y Chikungunya Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Virus Zika y Dengue Positivos, Virus Chikungunya Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Virus Zika y Chikungunya Positivos, Virus Dengue Negativo
-	+	-	+	-	+	Virus Dengue Positivo, Virus Zika y Chikungunya Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Virus Dengue y Chikungunya Positivos, Virus Zika Negativo
-	-	+	+/-	-	+	Virus Chikungunya Positivo, Virus Zika y Dengue Negativos
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

Tabla 5. Interpretación

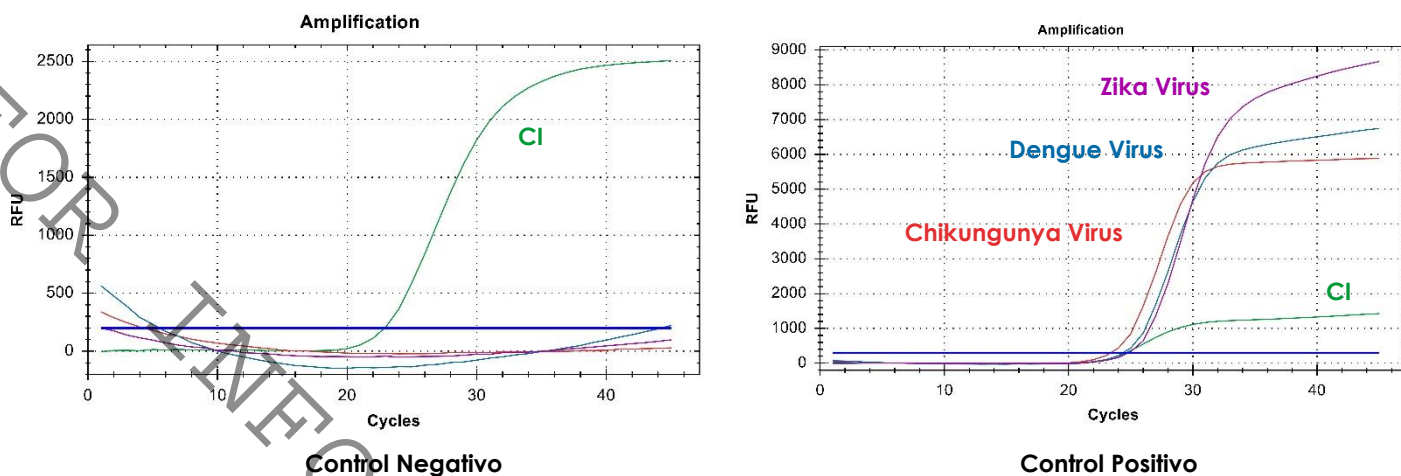
+: curva de amplificación
-: sin curva de amplificación

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™ Real-Time PCR Detection System.



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.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. 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.

10. Limitaciones del test

- 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 RNA extraído de muestras de suero y orina.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. 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 los virus Zika, Dengue y Chikungunya, 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* 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

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con muestras procedentes de los paneles INSTAND y QCMD. Las características clínicas del test VIASURE se testaron utilizando 102 muestras clínicas. Los resultados se compararon con los reports finales de los programas EQA:

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit	EQA Reports			Total
		+	-	
+		25	0	25
-		1	76	77
Total		26	76	102

Tabla 6. Resultados comparativos para Virus Zika

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit	EQA Reports			Total
		+	-	
+		27	0	27
-		3	72	75
Total		30	72	102

Tabla 7. Resultados comparativos para Virus Dengue

VIASURE <i>Zika, Dengue & Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit	EQA Reports			Total
		+	-	
+		29	1	30
-		2	70	72
Total		31	71	102

Tabla 8. Resultados comparativos para Virus Chikungunya

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar virus Dengue, Zika y Chikungunya utilizando VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit



12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Zika*, *Dengue* & *Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción. (Figura 2, 3 y 4).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar Zika Virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).

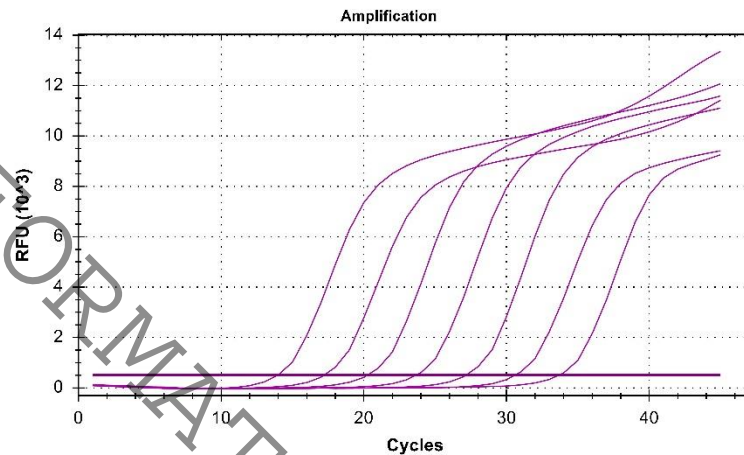


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar Dengue Virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

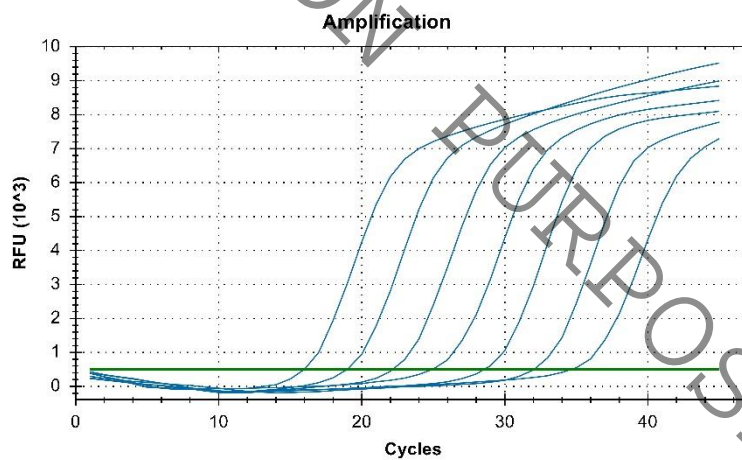
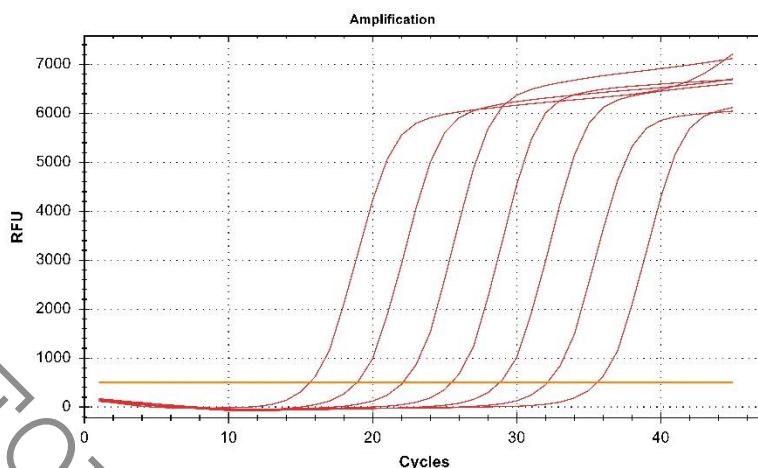


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar Chikungunya Virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los arbovirus más comunes.

No se detectaron reacciones cruzadas de Virus Zika con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus de la Encefalitis de San Luis cepa 17D	-
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-	Virus West Nile cepa H160/99	-
Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-	Virus West Nile Heja	-
Virus Dengue 3 cepa H87	-	Virus West Nile Ug37	-
Virus Dengue 4 cepa H241	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-
Plasmodium falciparum	-	Trypanosoma cruzi	-
Encefalitis japonesa	-		

Tabla 9. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

No se detectaron reacciones cruzadas de Virus Dengue con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus de la encefalitis de San Luis cepa 17D	-
Virus Zika cepa MR 766 (Uganda)	-	Virus West Nile cepa H160/99	-
Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)	-	Virus West Nile Heja	-
Virus Zika cepa 11468/16 (French Polynesia)	-	Virus West Nile Ug37	-
Zika Virus (African)	-	Virus de la fiebre amarilla cepa 17D	-
Zika virus cepa PF13/251013-18 (Asian)	-	Plasmodium falciparum	-
Encefalitis japonesa	-	Trypanosoma cruzi	-

Tabla 10. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

No se detectaron reacciones cruzadas de Virus Chikungunya con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Zika cepa MR 766 (Uganda)	-	Virus Dengue 3 cepa H87	-
Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)	-	Virus Dengue 4 cepa H241	-
Virus Zika cepa 11468/16(French Polynesia)	-	Virus de la Encefalitis de San Luis cepa 17D	-
Zika Virus (African)	-	Virus West Nile cepa H160/99	-
Zika virus cepa PF13/251013-18 (Asian)	-	Virus West Nile Heja	-
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-	Virus West Nile Ug37	-
Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-
Plasmodium falciparum	-	Encefalitis japonesa	-
Trypanosoma cruzi	-		-

Tabla 11. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit para Virus Zika evaluó frente a la cepa de Virus Zika cepa MR 766 (Uganda), Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia), Virus Zika cepa 11468/16(French Polynesia), Virus Zika (African) and Virus Zika cepa PF13/251013-18 (Asian) mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit para Virus Dengue se evaluó frente a Virus Dengue 1 cepa Hawaii, Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea C, Virus Dengue 3 cepa H87 y Virus Dengue 4 cepa H241, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit para Virus Chikungunya se evaluó frente a Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield (genotipo africano) y Virus Chikungunya cepa Martinique (genotipo asiático) mostrando un resultado positivo.











13. Bibliography/Bibliografía

1. R.S. Lanciotti *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14(8): 1232-1239.
2. O. Faye *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology Journal* 2013; 10: 311.
3. A.C. Gourinat *et al.* Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases* 2015; 21(1): 84-86.
4. D. Musso *et al.* Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology* 2015; 68: 53-55.
5. D. Mussi *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases* 2015 21(2): 359-361.
6. J. Mlakar. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine* 2016.
7. C. Drosten *et al.* Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(7): 2323-2330.



8. A. Dumoulin *et al.* Pan-dengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(9): 3104-3106.
9. J. Liu *et al.* Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54(1): 49-58.
10. S.K. Mardekian and A.L. Roberts. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International* 2015: 834371.
11. K.A. Tsetsarkin *et al.* Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Current Opinion in Virology* 2016; 16: 143-150.
12. R.S. Lanciotti *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases journal* 2007; 13(5): 764-767.
13. Centers for Disease Control and Prevention. (<http://www.cdc.gov/>).
14. World Health Organization. (<http://www.who.int/>).

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

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



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
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
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 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
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 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	Optical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD 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 ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

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

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	583/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ 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 registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: March 2019

FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



FOR INFORMATION PURPOSES ONLY



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.cerTEST.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC