

# Vitassay qPCR

## Japanese Encephalitis

PCR en tiempo real para la detección cualitativa del virus de la encefalitis japonesa, en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection of Japanese Encephalitis virus in human samples



## Uso previsto

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis permite la detección cualitativa del virus de la encefalitis japonesa mediante RT-PCR en tiempo real en muestras de sangre o LCR. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones producidas por el virus de la encefalitis japonesa.

## Referencias

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis 4 x 8-well strip, low profile 7041038

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis 4 x 8-well strip, high profile 7042038

## Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S038/ 7042S038	Japanese Encephalitis strips	-	4 tiras de 8 pocillos
7C038	Japanese Encephalitis Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

## Condiciones de Transporte y conservación.

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

## Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR en tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

El virus de la encefalitis japonesa (JE), un flavivirus, está estrechamente relacionado con los virus de la encefalitis del Nilo Occidental y San Luis. El virus JE se transmite a los humanos a través de la picadura de mosquitos de la especie *Culex* infectados, particularmente *Culex tritaeniorhynchus*.

El virus se mantiene en un ciclo entre los mosquitos y los hospedadores vertebrados, principalmente cerdos y aves zancudas. Los humanos son hospedadores incidentales o sin salida, porque generalmente no desarrollan concentraciones suficientemente altas de virus JE en sus corrientes de sangre para infectar a los mosquitos que se alimentan.

La transmisión del virus JE ocurre principalmente en áreas agrícolas rurales, a menudo asociadas con la producción de arroz y el riego por inundación. En algunas zonas de Asia, estas condiciones pueden ocurrir cerca de los centros urbanos.

Menos del 1% de las personas infectadas con el virus de la encefalitis japonesa (JE) desarrollan una enfermedad clínica. En las personas que desarrollan síntomas, el período de incubación (tiempo desde la infección hasta la enfermedad) suele ser de 5 a 15 días. Los síntomas iniciales a menudo incluyen fiebre, dolor de cabeza y vómitos. Los cambios en el estado mental, los síntomas neurológicos, la debilidad y los trastornos del movimiento pueden desarrollarse en los próximos días. Las convulsiones son comunes, especialmente entre los niños.

## Principio del test

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *NS2A* del virus encefalitis japonesa. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido, de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de virus encefalitis japonesa se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' nucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Además, un control interno permite la detección de

una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

## Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

## **Procedimiento**

### **Toma de muestra, preparación y extracción de RNA**

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAcube instrument (QIAGEN).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

### **Preparación del control positivo**

Reconstituir el contenido liofilizado del Japanese Encephalitis Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

### **Preparación de la reacción**

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

### **Programación del termociclador**

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (\*) a través de los canales FAM (Japanese Encephalitis) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver adjunto II).

### **Análisis e interpretación de resultados**

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

#### **Control positivo**

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en el canal FAM.

#### **Control negativo**

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

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

Japanese Encephalitis FAM	Control Interno HEX	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Japanese Encephalitis Positivo
-	+	-	+	Japanese Encephalitis Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

**Positivo (+):** Señal de amplificación

**Negativo (-):** No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

### Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

### Características técnicas

#### Sensibilidad y especificidad clínica

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis se evaluó con programas QCMD de virus tropicales (West Nile Virus y Dengue) de los años 2014, 2017 y 2018. Estos programas contenían 6 muestras positivas para la encefalitis japonesa y se detectaron correctamente. Los resultados se compararon con los informes finales.

Estos resultados indican que Vitassay qPCR Japanese Encephalitis muestra una alta sensibilidad y especificidad para detectar el virus de la encefalitis japonesa.

#### Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de la encefalitis japonesa ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de RNA viral por reacción.

## Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de la encefalitis japonesa fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Encefalitis japonesa		
<i>Candida albicans</i>	Parechovirus Tipo 3	Herpesvirus humano 6 (HHV6) Tipo B
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	Citomegalovirus cepa AD169	Virus Zika (cepa Africana)
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Virus Varicella Zoster Ellen	Virus Zika (Asian cepa PF13/251013-18)
<i>Enterococcus durans</i>	Virus Varicella Zoster OKA	Virus Zika (French Polynesian cepa 11474/16)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coxsackievirus A24	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield
<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	Coxsackievirus A9	Virus Dengue 1 cepa Hawaii
<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	Coxsackievirus B3	Virus Dengue 2 cepa New Guinea C
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2b	Echovirus 30	Virus Dengue 3 cepa H87
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	Echovirus Tipo 11	Virus Dengue 4 cepa H241
<i>Listeria innocua</i> serovar 6a	Enterovirus 68	Virus St Louis Encephalitis cepa 17D
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	Enterovirus 71	Virus West Nile cepa NY99
<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	Virus Epstein Barr	Virus West Nile Heja
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Virus Herpes simple1 (HSV1) cepa MacIntyre	Virus West Nile Ug37
<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	Virus Herpes simple 2 (HSV2) MS	Virus Tick-Borne encephalitis (cepa Neudorfl)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	Herpesvirus humano 6 (HHV6) cepa Z29	Virus Yellow Fever (cepa 17D)
<i>Plasmodium falciparum</i> (cepa 3D7)	Herpesvirus humano 6 (HHV6) Tipo A	

## Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Japanese Encephalitis fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando encefalitis japonesa como molde.

## Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis ha sido validado en los siguientes equipos:



- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

### **Limitaciones**

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por encefalitis japonesa. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado con muestras de sangre y LCR. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas 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 del RNA 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 encefalitis japonesa, 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.

## Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

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

\* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

## Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>	FAM	Green	Al configurar los canales, 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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Intended use

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis allows the qualitative detection of Japanese encephalitis virus by real-time RT-PCR in blood or CSF samples. The product is intended for use in the diagnosis of Japanese encephalitis infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

## References

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis 4 x 8-well strip, low profile 7041038

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis 4 x 8-well strip, high profile 7042038

## Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S038/ 7042S038	Japanese Encephalitis strips	-	4x8-well strip
7C038	Japanese Encephalitis Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Rehydration Buffer	green	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

## Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

## Additional equipment and material required

- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- RNA extraction kit
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

Japanese encephalitis (JE) virus, a flavivirus, is closely related to West Nile and St. Louis encephalitis viruses. JE virus is transmitted to humans through the bite of infected *Culex* species mosquitoes, particularly *Culex tritaeniorhynchus*.

The virus is maintained in a cycle between mosquitoes and vertebrate hosts, primarily pigs and wading birds. Humans are incidental or dead-end hosts, because they usually do not develop high enough concentrations of JE virus in their bloodstreams to infect feeding mosquitoes.

JE virus transmission occurs primarily in rural agricultural areas, often associated with rice production and flooding irrigation. In some areas of Asia, these conditions can occur near urban centers.

Less than 1% of people infected with Japanese encephalitis (JE) virus develop clinical illness. In persons who develop symptoms, the incubation period (time from infection until illness) is typically 5-15 days. Initial symptoms often include fever, headache, and vomiting. Mental status changes, neurologic symptoms, weakness, and movement disorders might develop over the next few days. Seizures are common, especially among children.

## Principle of the test

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *NS2A* gene encoded by the Japanese Encephalitis genome. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The presence of Japanese Encephalitis is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis is a ready-to used test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the target sequence is detected through the FAM channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

## Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.

- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

## **Procedures**

### **Specimen collection, processing and RNA extraction**

For pretreatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAcube instrument (Qiagen).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

### **Positive control preparation**

Reconstitute the lyophilized Japanese Encephalitis Positive Control (red tube) with the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

## Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

## Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (\*) through the FAM (Japanese Encephalitis) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none (attached II).

## Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

### Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for Japanese Encephalitis, which validates the reaction.



## Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal for Japanese Encephalitis which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

Japanese Encephalitis FAM	Internal Control HEX	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Japanese Encephalitis Positive
-	+	-	+	Japanese Encephalitis Negative
+	+	+	+	Invalid
-	-	-	-	Invalid

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

## Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

## Performance evaluation

### Clinical sensitivity and specificity

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis was evaluated with QCMD programs of tropical viruses (West Nile Virus and Dengue) of the years 2014, 2017 and 2018. These programs contained 6 positive samples for Japanese encephalitis and were detected correctly. The results were compared with the final reports.

These results indicate that Vitassay qPCR Japanese Encephalitis shows a high sensitivity and specificity for detecting Japanese encephalitis virus.

## Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Japanese Encephalitis template ranging from  $10^7$  to  $10^1$  copies/rxn. This assay has a detection limit of  $\geq 10$  viral RNA copies per reaction.

## Analytical specificity

The analytical specificity for Japanese Encephalitis was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Japanese Encephalitis		
<i>Candida albicans</i>	Parechovirus Type 3	Human herpesvirus 6 (HHV6) Type B
<i>Escherichia coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	Citomegalovirus strain AD169	Zika Virus (African strain)
<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Varicella Zoster Virus Ellen	Zika Virus (Asian strain PF13/251013-18)
<i>Enterococcus durans</i>	Varicella Zoster Virus OKA	Zika Virus (French Polynesian strain 11474/16)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Coxsackievirus A24	Chikungunya virus strain S27 Petersfield
<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	Coxsackievirus A9	Dengue 1 virus strain Hawaii
<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	Coxsackievirus B3	Dengue 2 virus strain New Guinea C
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 1/2b	Echovirus 30	Dengue 3 virus strain H87
<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	Echovirus Type 11	Dengue 4 virus strain H241
<i>Listeria innocua</i> serovar 6a	Enterovirus 68	St Louis Encephalitis virus strain 17D
<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	Enterovirus 71	West Nile virus strain NY99
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	Epstein Barr virus	West Nile virus Heja
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Herpes simplex virus 1 (HSV1) MacIntyre strain	West Nile virus Ug37
<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	Herpes simplex virus 2 (HSV2) MS	Tick-Borne encephalitis virus (cepa Neudorfl)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	Human herpesvirus 6 (HHV6) strain Z29	Yellow Fever Virus (17D strain)
<i>Plasmodium falciparum</i> (3D7 strain)	Human herpesvirus 6 (HHV6) Type A	

## Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Japanese Encephalitis was confirmed by the real-time amplification using Japanese Encephalitis as template.

## Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Japanese Encephalitis infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with blood samples and CSF. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical 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 Japanese Encephalitis, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

\* See Attached III to configure exposure settings.

## Attached II: Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene®Q Qiagen</b>	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

### Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

### Bibliography/Bibliografía

1. <https://www.cdc.gov/japaneseencephalitis/>

## Trademarks

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™ and Mx3005™ 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

## Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

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



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa  
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

[www.vitassay.com](http://www.vitassay.com)