

Vitassay qPCR

Dengue 1+2+3+4

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los serotipos del virus Dengue (1+2+3+4) en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Dengue virus serotypes (1+2+3+4) in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4, permite la detección y diferenciación de los serotipos del virus Dengue (1,2,3 y 4) mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por el virus Dengue.

Referencias

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 8x8 -well strip, low profile	7041006
Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 8x8-well strip, high profile	7042006

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S006A/ 7042S006A	Dengue 1+4 Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S006B/ 7042S006B	Dengue 2+3 Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C006	Dengue 1+2+3+4 Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8 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 separar en alcuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR a 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 dengue es una enfermedad viral transmitida por mosquitos que se ha propagado rápidamente en los últimos años. El virus del Dengue se transmite generalmente por mosquitos hembra de las especies *Aedes aegypti* y, en menor medida *Ae. albopictus*. A través de un estudio de la prevalencia del Dengue se ha estimado que, 3,9 billones de personas en 128 países están en riesgo de infección por virus Dengue.

La fiebre del dengue puede ser causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) genéticamente relacionados, pero antigénicamente distintos.

Muchas personas pueden permanecer asintomáticas durante un caso leve de fiebre del Dengue. Normalmente los síntomas aparecen de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado. Los signos y síntomas de la fiebre del Dengue incluyen: fiebre alta, dolores de cabeza, musculares, óseos y articular, dolor detrás de los ojos. También se puede experimentar erupción cutánea, náuseas, vómitos y rara vez, sangrado de las encías y de la nariz. En algunos casos, los síntomas son peores y pueden llegar a amenazar la vida del paciente. Los vasos sanguíneos a menudo se dañan, y el recuento plaquetario en la sangre desciende.

Existen múltiples factores que contribuyen al Dengue severo, como las infecciones secundarias, la edad, la carga viral, además de infectar el serotipo y el genotipo. Los hallazgos ilustran la singularidad de cada serotipo en la producción de epidemias y enfermedades graves y subrayan la importancia de la vigilancia a largo plazo de los serotipos del Dengue en la comprensión de la epidemiología de estos virus. Es por ello que un serotipado del virus del Dengue es esencial.

El Dengue puede diagnosticarse mediante el aislamiento del virus, mediante test serológicos (detección de antígenos y anticuerpos) o mediante métodos moleculares. Métodos como RT-PCR son los mayormente utilizados para detectar los genes codificados por el genoma viral durante la fase aguda en muestras de suero.

Esta detección coincide con la viremia y la fase febril de inicio de la enfermedad. Es importante tener en cuenta que los métodos serológicos pueden dar reacciones cruzadas con otros flavivirus incluyendo West Nile (WNV), Virus de la Encefalitis de San Luis (SLE), Virus de la Encefalitis de japonesa (JEV) y Virus de la Fiebre Amarilla (YFV).

Principio del test

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de la zona del gen *NS5* (serotipo Dengue 1 (DEN-1)), gen *envelope* (serotipo Dengue 2(DEN-2)), gen *prM* (serotipo Dengue 3 (DEN-3)) y gen *NS2A* (serotipo Dengue 4 (DEN-4)). 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 los virus se realiza mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4, se trata de un test listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de DEN-1 y/o DEN-4. La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de DEN-2 y/o DEN-3. Tras la reacción de amplificación los serotipos 1 y 3 del virus Dengue se detectan en el canal FAM, los serotipos 2 y 4 del virus Dengue se detectan en el canal ROX y 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:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)

QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAcube instrument (QIAGEN)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Dengue 1+2+3+4 Positive Control (tubo rojo) con 200 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 RNA 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:

Etap	Temperatura	Tiempo	Ciclos
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 (serotipos 1 y 3 del virus Dengue) y ROX (serotipos 2 y 4 del virus Dengue) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real-Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX 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 a 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 los canales de los serotipos 1 y 3 del virus Dengue (FAM) y serotipos 2 y 4 del virus Dengue (ROX).

Control negativo

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

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:

Primera tira (DEN-1 y/o DEN-4)					
Dengue 1 (FAM)	Dengue 4 (ROX)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Serotipos 1 y 4 de Dengue Positivos
-	-	+	-	+	Serotipos 1 y 4 de Dengue Negativos
+	-	+/-	-	+	Serotipo 1 de Dengue Positivo y Serotipo 4 de Dengue Negativo
-	+	+/-	-	+	Serotipo de Dengue 4 Positivo y Serotipo de Dengue 1 Negativo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido
Segunda tira (DEN-2 y/o DEN-3)					
Dengue 2 (ROX)	Dengue 3 (FAM)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Serotipos 2 y 3 de Dengue Positivos
-	-	+	-	+	Serotipos 2 y 3 de Dengue Negativos
+	-	+/-	-	+	Serotipo 2 de Dengue Positivo y Serotipo 3 de Dengue Negativo
-	+	+/-	-	+	Serotipo de Dengue 3 Positivo y Serotipo de Dengue 2 Negativo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los virus 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 Dengue 1+2+3+4 se evaluó con los programas: QCMD 2017 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA17) y QCMD 2018 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA18). Ambos programas consistían en paneles de 10 muestras disueltas en medio de transporte positivas o no al patógeno de estudio (en total 20 muestras analizadas). Además, las muestras del panel DENVRNA17 fueron estudiadas con el test de diagnóstico molecular RealStar® Dengue RT-PCR Kit (Altona Diagnostics) y los resultados se compararon con los obtenidos con Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4. Se obtuvo el mismo resultado con ambos kits.

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 detectó correctamente todas las muestras de ambos paneles. Estos resultados indican que Vitassay qPCR Dengue muestra una alta sensibilidad y especificidad para detectar el virus del Dengue.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de los diferentes virus (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de los diferentes serotipos del virus del Dengue fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes virus, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Dengue 1+2+3+4		
Virus Chikungunya S27 Petersfield	Virus West Nile H160/99	Virus Yellow Fever 17D
Virus Zika cepa MR 766	Virus West Nile Heja	
Virus St Louis Encephalitis 17D	Virus West Nile Ug37	

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4, para el virus Dengue fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando Dengue 1 cepa Hawaii, Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea, Virus Dengue 3 cepa H87 y Virus Dengue 4 cepa H241.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4, ha sido probado en los siguientes equipos:

- LightCycler 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTLite Real Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

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 virus Dengue 1, 2, 3 y/o 4. 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 en muestras de suero. 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 los diferentes virus, 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	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
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
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	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™ 2 Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	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
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	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	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	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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 allows the detection and differentiation of Dengue virus serotypes (1, 2, 3 y/o 4) by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of, Dengue virus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 8x8 -well strip, low profile	7041006
Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 8x8-well strip, high profile	7042006

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S006A/ 7042S006A	Dengue 1+4 Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S006B/ 7042S006B	Dengue 2+3 Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C006	Dengue 1+2+3+4 Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8x8 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

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

- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Dengue is a mosquito-borne viral disease that has rapidly spread in recent years. Dengue virus is transmitted by female mosquitoes mainly of the species *Aedes aegypti* and, to a lesser extent, *Ae. Albopictus*. One study, of the prevalence of dengue, estimates that 3.9 billion people, in 128 countries, are at risk of infection with dengue viruses.

Dengue fever can be caused by any of four genetically related but antigenically distinct dengue virus (DENV) serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4).

Many people may experience no symptoms during a mild case of dengue fever. When symptoms do occur, they usually begin four to 10 days after you are bitten by an infected mosquito. Signs and symptoms of dengue fever most commonly include: high fever, headaches, muscle, bone and joint pain, pain behind your eyes. You might also experience widespread rash, nausea and vomiting and rarely, minor bleeding from your gums or nose. In some cases, symptoms worsen and can become life-threatening. Blood vessels often become damaged and leaky. And the number of clot-forming cells (platelets) in your bloodstream drops.

Multiple factors have been suggested to contribute to severe dengue such as secondary infections, age, viral load as well as infecting serotype and genotype. Findings illustrate the uniqueness of each serotype in producing epidemics and severe disease and underscore the importance of long-term surveillance of dengue serotyping in understanding the epidemiology of these viruses. It is for that a Dengue virus serotyping is essential.

Dengue can be diagnosed by isolation of the virus, by serological tests (antigen and antibodies detection), or by molecular methods. Methods such as one-step real time RT-PCR are now widely used to detect dengue viral genes in acute-phase serum samples. This detection coincides with the viremia and the febrile phase of illness onset. It's important to consider that serological methods have cross reactivity with other flaviviruses including West Nile virus (WNV), St. Louis encephalitis virus (SLE), Japanese encephalitis virus (JEV) and yellow fever virus (YFV).

Principle of the test

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *NS5* gene (Dengue serotype 1 (DEN-1)), *envelope* gene (Dengue virus serotype 2 (DEN-2)), *prM* gene (Dengue serotype 3 (DEN-3)) and *NS2A* gene (Dengue serotype 4 (DEN-4)). 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 the virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 test is a ready-to-use 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. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of DEN-1 and/or DEN-4. DEN-1 Virus RNA targets are amplified and detected in FAM channel and DEN-4 Virus RNA targets are amplified and detected in ROX channel. The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of DEN-2 and/or DEN-3. DEN-2 Virus RNA targets are amplified and detected in ROX channel, DEN-3 Virus RNA targets are amplified and detected in FAM channel. Both multiplex reactions contain an internal control (IC) which is amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

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 pre-treatment 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:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega).

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized *Dengue 1+2+3+4* Positive Control (red tube) with the 200 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) into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls 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 (Dengue 1 and 3), ROX (Dengue 2 and 4) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, 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 FAM (Dengue 1 and 3) and ROX (Dengue 2 and 4), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM and ROX 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:

First strip (DEN-1 and/or DEN-4)					
DEN-1 Virus (FAM)	DEN-4 Virus (ROX)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Dengue serotypes 1 and 4 Positive
-	-	+	-	+	Dengue serotypes 1 and 4 Negative
+	-	+/-	-	+	Dengue serotype 1 Positive and Dengue serotype 4 Negative
-	+	+/-	-	+	Dengue serotype 4 Positive and Dengue serotype 1 Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail
Second strip (DEN-2 and/or DEN-3)					
DEN-2 Virus (ROX)	DEN-3 Virus (FAM)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Dengue serotypes 2 and 3 Positive
-	-	+	-	+	Dengue serotypes 2 and 3 Negative
+	-	+/-	-	+	Dengue serotype 2 Positive and Dengue serotype 3 Negative
-	+	+/-	-	+	Dengue serotype 3 Positive and Dengue serotype 2 Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) 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 Dengue 1 + 2 + 3 + 4 was evaluated with the programmes: QCMD 2017 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA17) and QCMD 2018 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA18). Both programmes consisted of panels of 10 samples dissolved in transport medium positive or not to the studied pathogen (in total 20 samples). In addition, samples from the DENVRNA17 panel were studied with the RealStar® Dengue RT-PCR Kit (Altona Diagnostics) and the results were compared with those obtained with Vitassay qPCR Dengue 1 + 2 + 3 + 4. The same results were obtained with both kits.

Vitassay qPCR Dengue 1 + 2 + 3 + 4 correctly detected all samples from both panels. These results indicate that Vitassay qPCR Dengue shows a high sensitivity and specificity to detect the Dengue virus.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Dengue 1+2+3+4 virus templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Dengue 1+2+3+4 virus was tested within the panel of following virus, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Dengue 1+2+3+4		
Chikungunya virus S27 Petersfield	West Nile virus strain H160/99	Yellow Fever virus strain 17D
Zika virus strain MR 766	West Nile virus strain Heja	
St Louis Encephalitis virus strain 17D	West Nile virus strain Ug37	

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 Virus Real Time PCR for Dengue virus serotypes was confirmed by the real time amplification using Dengue 1 virus strain Hawaii, Dengue 2 virus strain New Guinea C, Dengue 3 virus strain H87 and Dengue 4 virus strain H241.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Dengue 1+2+3+4 has been validated on the following equipments:

- LightCycler 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTLite Real Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

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, Dengue 1,2,3,4 virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with clinical samples. 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 Dengue 1, 2, 3 and 4 viruses, 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
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
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
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	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	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	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
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation 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 ROX is 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	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
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. G.A. Santiago et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013; 7(7):e2311.
2. Drosten C. 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.
3. Dumoulin A. et al. Pan-dengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(9): 3104-3106.
4. Liu J. 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.
5. Mardekian S.K. and Roberts A.L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International* 2015: 834371.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue (<http://www.cdc.gov/dengue/>).
7. World Health Organization. Dengue (<http://www.who.int/topics/dengue/en/>).
8. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Alphaviruses. In: *Fields Virology*. 3 rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996;1: 858-98.
9. Y. Chee-Fu et al. Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 92(5): 999–1005.
10. N. Ananda et al. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68(2), 2003, 191–202.

Trademarks

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™ 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