

VA Vitassay

Real-Time PCR Kits

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.

CE IVD

ES EN



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, 4x8-well strip, low profile	7041038
Vitassay qPCR Japanese Encephalitis, 4x8-well strip, high profile	7042038

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041038 y 7042038:

Código	Reactivo/Material	Descripción	Rango de concentración	Color	Cantidad
7041S038/ 7042S038	Japanese Encephalitis strips	Lioprotectores y estabilizadores	±6 g/100 mL *	-	4 tiras de 8 pocillos
		dNTPs	±1 mM *		
		Cebadores y sondas	0,2-1 nMol/μL *		
		Enzimas	10-100 U/rxn *		
7C038	Japanese Encephalitis Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	1,9x10 ⁴ copias/μL*	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Solución salina	±13 mM	verde	1 vial x 1,8 mL
		Tampón (TRIS, pH)	±67 mM		
7003N	Negative control	Agua libre de RNAsa/DNAsa	1 g/mL	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	Tapas ópticas para sellar las tiras en el ciclo térmico	-	-	4 tiras de 8 tapones

* En el caso del componente en formato estabilizado, el rango de concentración se refiere a después de la rehidratación.

Material y equipamiento necesario, no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (-30°C a -10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de RNA
- Equipo de PCR en tiempo real (termociclador)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo
- Blanco de muestra (Ver Extracción RNA).
- Material de control para la etapa de la transcripción reversa (RNA de referencia o partículas virales de RNA).

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits (antes del uso) puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez en uso ver las condiciones de almacenamiento de cada componente. Evitar agitaciones durante el transporte para prevenir la fuga de líquidos.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. La estabilidad del control positivo se ha validado tras 6 ciclos de congelación y descongelación. Sin embargo, se recomienda distribuir en alícuotas para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

- Para el uso adecuado del kit, se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse en las bolsas de aluminio proporcionadas con el gel de sílice dentro y cerradas con el cierre zip para evitar el contacto con la luz o la humedad y guardarse a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit. Una vez que los pocillos han sido rehidratados debe realizarse de forma inmediata la adición del ácido nucleico y la RT-qPCR.
- Una vez abiertos los componentes Resuspension buffer, PCR grade water y Negative Control deben ser almacenados a 2-40°C durante la vida útil indicada en la etiqueta del kit.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Resumen

El virus de la encefalitis japonesa (JE) es un virus ARN envuelto del género *Flavivirus*, familia Flaviviridae (ECDC Factsheet Japanese Encephalitis, Mar2022). El virus JE existe como un fenotipo y cinco genotipos distinguibles (Roberts A. et al, 2020). El virus JE está estrechamente relacionado con los virus de la encefalitis del Nilo Occidental y de San Luis y es la principal causa de encefalitis prevenible mediante vacunación en Asia y el Pacífico occidental (CDC Japanese Encephalitis Virus, Dec2023). La transmisión del virus de la encefalitis japonesa se produce principalmente en zonas agrícolas rurales, a menudo asociadas con la producción de arroz y el riego por inundación. En algunas zonas de Asia, estas condiciones pueden darse cerca de centros urbanos (CDC Japanese Encephalitis Virus Transmission, Dec2022).

El virus de la encefalitis japonesa es un virus transmitido por mosquitos que se propaga por la picadura de mosquitos *Culex* portadores, principalmente *Culex tritaeniorhynchus* y *Culex vishnui* (Sharma KB. et al., 2021). El virus se mantiene en un ciclo zoonótico entre mosquitos (el vector) y huéspedes vertebrados, principalmente cerdos y aves zancudas (también denominados huéspedes amplificadores o reservorios naturales). Los humanos son huéspedes incidentales o finales, porque normalmente no desarrollan concentraciones suficientemente altas del virus de la encefalitis japonesa en su torrente sanguíneo como para infectar a los mosquitos que se alimentan de él (CDC Japanese Encephalitis Virus Transmission, Dec2022) (Roberts A. et al, 2020).

La mayoría de las personas infectadas por JE virus no presentan síntomas o sólo tienen síntomas leves. Sin embargo, un pequeño porcentaje de personas infectadas desarrollan inflamación del cerebro (encefalitis), con síntomas como dolor de cabeza, fiebre, desorientación, convulsiones, debilidad y coma. Aproximadamente 1 de cada 4 casos es mortal (CDC Japanese Encephalitis Virus, Dec2023). Por término medio, 1 de cada 250 personas infectadas desarrolla una enfermedad neuroinvasiva grave. El periodo de incubación suele ser de 5 a 15 días (ECDC Factsheet Japanese Encephalitis, Mar2022).

Según las estadísticas sobre el virus JE, facilitadas por la OMS en 2019, 24 países de las regiones de Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental tienen transmisión endémica del virus JE, lo que expone a 3 billones de personas al riesgo de infección (Roberts A. et al, 2020). Una revisión bibliográfica estima casi 68 000 casos clínicos de JE en todo el mundo cada año, con aproximadamente 13 600 a 20 400 muertes (WHO Japanese Encephalitis, May2019). La tasa de letalidad entre las personas con encefalitis puede llegar al 30%, más en niños. Pueden producirse secuelas neurológicas o psiquiátricas permanentes en el 30-50% de los casos (Roberts A. et al, 2020).

La detección de la infección por el virus de la encefalitis japonesa es problemática debido a la corta duración de la viremia y a la naturaleza asintomática de la infección (Roberts A. et al, 2020). El diagnóstico de la infección por el virus de la encefalitis japonesa se basa en la detección de anticuerpos IgM específicos que están presentes en el líquido cefalorraquídeo y el suero de los pacientes y la confirmación mediante ensayos de neutralización. El diagnóstico del virus de la encefalitis japonesa también puede realizarse mediante la detección viral directa por RT-PCR realizada en sangre o líquido cefalorraquídeo de pacientes en la fase inicial de la enfermedad (ECDC Factsheet Japanese Encephalitis, Mar2022).

Principio de la prueba

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *NS5* 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. Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Diana	Canal detección
Gen NS5 (virus <i>encefalitis japonesa</i>)	FAM
Control interno (CI)	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 utilizar el kit sin haber leído y entendido la información sobre procedimientos, precauciones y limitaciones proporcionada en las instrucciones de uso.
- 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 o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Utilizar las tiras inmediatamente después de haber retirado el aluminio protector para proteger la mezcla de reacción de la luz solar. No se recomienda dejar las tiras abiertas sin resuspender. Una vez rehidratados los pocillos requeridos, se debe llevar a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- Se recomienda cortar los pocillos requeridos/necesarios antes de retirar el sello protector de toda la tira. Guardar el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip después de cada uso (no retirar las bolsas de desecante del sobre). Elimine el exceso de aire de las bolsas antes de sellar.
- No usar el producto cerca de disolventes, con el fin de evitar el deterioro de la etiqueta.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Rehidratar los viales inmediatamente después de abrir el sobre del Control positivo y utilizarlos en la reacción de PCR o conservarlos adecuadamente. Dejar el vial abierto sin resuspender puede ocasionar el deterioro del reactivo.
- 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. Una vez finalizada la prueba lávese bien las manos.
- 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. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- 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 y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Para cada muestra debe usarse una punta nueva. Es necesario cambiar de guantes antes de manipular los reactivos.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- El producto Vitassay qPCR Japanese Encephalitis solamente se ha validado con los equipos mencionados en el Apartado Termocicladores compatibles de estas Instrucciones de uso.
- Debe asegurarse de que la configuración de las condiciones en el termociclador se realiza siguiendo las instrucciones de la sección "Programación del termociclador".
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud de las mismas.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR Japanese Encephalitis ha sido testado en muestras de sangre y de líquido cefalorraquídeo (LCR). El usuario debe validar otros tipos de muestras.

En general, las muestras clínicas deben recogerse adecuadamente en recipientes limpios con o sin medio de transporte (según el tipo de muestra), etiquetarse correctamente y procesarse con prontitud para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras de sangre deben transportarse a 4°C durante 24 horas. Para un transporte de mayor duración (más de 24 horas), se recomienda el envío a -20°C o menos (Yong W., 2019). Las muestras de sangre pueden conservarse a 4°C durante 24 horas o congeladas a -20°C o menos (-80°C idealmente) para su conservación durante más tiempo. En el caso de las muestras LCR, deben conservarse congeladas a -20°C o menos (-80°C idealmente). Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- Yong W. (eds) Biobanking. Methods in Molecular Biology, vol 1897 (2019) Humana Press, New York, NY.

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 (QIAGEN).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex).

Para el uso de kits de extracción de RNA distintos de los mencionados, la validación de éstos debe ser realizada por el usuario final, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

Debe tener en cuenta que el control positivo y negativo no deben ser extraídos. Para monitorizar y controlar el proceso de extracción y descartar posibles contaminaciones, se puede extraer un blanco de muestra (no suministrado en el kit) que debería consistir en la misma matriz que las muestras clínicas (matriz real o simulada), y previamente haber sido caracterizado como negativo para todas las dianas.

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Japanese Encephalitis Positive Control (tubo rojo) con 400 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). Se recomienda no rehidratar los pocillos que no se necesiten. Los pocillos no utilizados pueden cortarse fácilmente antes de retirar el aluminio protector y almacenarse como se indica en la Sección Condiciones de Transporte y conservación.
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras a utilizar.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído de cada muestra, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo reconstituido (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con las tapas ópticas suministradas. Se recomienda centrifugar brevemente.
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

Etapa	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/elongación (*) a través de los canales FAM (Japanese Encephalitis virus) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno, CI). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección adecuado.

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación comprobar la emisión de la señal del control interno.

Se recomienda establecer en cada ensayo los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por el usuario final. Para ello, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo para cada canal y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). En el caso de que el equipo utilizado establezca un umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Una vez fijado el valor umbral, se pueden interpretar las muestras del ensayo.

La naturaleza química de los diferentes fluoróforos puede afectar al valor umbral de los canales, así como las diferentes intensidades de señal pueden influir en el valor umbral para diferentes instrumentos.

Además, se recomienda incluir un blanco (muestra negativa confirmada de la misma matriz que las muestras analizadas) para las dianas detectadas con el fin de establecer la línea de base del ensayo.

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 ($Ct \leq 40$) en el canal FAM (Japanese Encephalitis).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal ($Ct > 40$ o no señal) en el canal FAM (Japanese Encephalitis).

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos del control positivo y control negativo.

El experimento es inválido si hay ausencia de señal en el control positivo o hay señal de amplificación en el control negativo, exceptuando el canal HEX, VIC o JOE que ha de mostrar amplificación (correspondiente al CI). En cualquiera de estos supuestos, el ensayo se debe de repetir.

Una vez validado el resultado de los controles, para la interpretación de los resultados de las muestras, **seleccione solo los canales donde se detectan las dianas** y con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados:

Control Negativo	Control Positivo	Japanese Encephalitis FAM	Control Interno HEX	Interpretación
-	+	+	+/- ¹	Japanese Encephalitis RNA detectado
-	+	-	+ ²	Japanese Encephalitis RNA No detectado ²
-	+	-	- ²	Inválido ²

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct ≤40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct >40 o no señal)

¹ En ocasiones, en el caso de las muestras clínicas, 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal).

² En el caso de que los genes diana de Japanese Encephalitis virus resulten negativos, el Control Interno debe mostrar una señal de amplificación con Ct ≤ 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct > 35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la RT-qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo preferiblemente por duplicado en función del material disponible: a) obtener un nuevo espécimen, volver a extraer y testar (ideal), b) volver a extraer y testar otra alícuota de la misma muestra o, c) repetir la RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional sanitario, en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas diagnósticas.

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 el virus de la encefalitis japonesa y se detectaron correctamente. Los resultados se compararon con los informes finales.

Estos resultados indican que Vitassay qPCR Japanese Encephalitis muestra un alto nivel de concordancia para detectar el virus de la encefalitis japonesa.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del cDNA molde de la *encefalitis japonesa* (10⁷-10¹ 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 la encefalitis japonesa fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Pruebas de reacción cruzada		
<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 (asiática 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 subsp. 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 subsp. 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, mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

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

- 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)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I

I: Para el equipo Rotor-Gene® Q el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos del equipo.

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).

Para más información sobre la compatibilidad del termociclador basada en datos bibliográficos y los canales de detección más comunes, contactar con el fabricante (info@vitassay.com).

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 Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

Limitaciones

- Esta prueba 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; los ácidos nucleicos deben ser extraídos de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a resultados falsos negativos.
- Es posible observar fenómenos “crosstalk” en canales vacíos del termociclador (en el caso de que no haya diana que detectar), por tanto, es necesario que al interpretar los resultados se seleccionen solo los canales donde las dianas amplifican.
- En ocasiones se pueden detectar ácidos nucleicos molde diana con un número de copias inferior al límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. No es posible correlacionar los valores Ct obtenidos en la PCR con la concentración de la muestra, ya que éstos dependen del termociclador utilizado y de la propia ejecución. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada con encefalitis japonesa, ya sea por el control positivo durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de los ácidos nucleicos molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de los ácidos nucleicos); c) Degradación de los ácidos nucleicos durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga del microorganismo esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante; g) mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de cepas nuevas o desconocidas.
- La detección de los ácidos nucleicos no implica la presencia de microorganismos viables y/o infecciosos ni que estos microorganismos sean los agentes causantes de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por Japanese encephalitis virus y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimas para la identificación de Japanese encephalitis virus y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar los microorganismos.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con estos microorganismos, y se han descartado otras enfermedades, la posibilidad de un resultado falso negativo no debería desestimarse y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR (incluso si es el mismo modelo), el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- El Control Positivo y el Control Negativo no deben ser extraídos.
- Se recomienda incluir un blanco de muestra durante el proceso de extracción y RT-qPCR para descartar posibles contaminaciones y evitar no detectar resultados falsos positivos probables.
- Se recomienda el uso de un material de control apropiado como RNA de referencia o partículas virales de RNA para el control de la etapa de transcripción reversa. Estos controles no se incluyen en el kit.
- Es posible que la detección de algunos genotipos circulantes pertenecientes al genotipo IV (GIV) del virus de la encefalitis japonesa se vea comprometida.



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 4x8-well strip, low profile	7041038
Vitassay qPCR Japanese Encephalitis 4x8-well strip, high profile	7042038

Provided Reagents

In references 7041038 and 7042038:

Reference	Reagent/Material	Description	Concentration Range	Colour	Amount
7041S038/ 7042S038	Japanese Encephalitis strips	Lyoprotectors and Stabilizers	±6 g/100 mL *	-	4 x 8-well strips
		dNTPs	±1 mM *		
		Primers and Probes	0,2-1 nMol/μL *		
		Enzymes	10-100 U/rxn *		
7C038	Japanese Encephalitis Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	1,9x10 ⁴ copies/μL*	red	1 vial
7001A	PCR grade water	RNAsa/DNAsa free water	1 g/mL	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	Saline Solution	±13 mM	green	1 vial x 1,8 mL
		Buffer (TRIS, pH)	±67 mM		
7003N	Negative control	RNAsa/DNAsa free water	1 g/mL	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	Optical caps for sealing strips during thermal cycling	-	-	4 x 8-cap strips

* For component in stabilized format, the concentration range means after rehydration.

Material and equipment required, not provided

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves
- Blank sample (See RNA extraction)
- Control material for reverse transcription step (such as reference RNA or viral RNA particles).

Transport and storage

- Transport and storage of the kits (before use) can be performed at 2-40°C until the expiry date stated on the label. Once in use, see storage conditions for each component. Avoid shaking during transport to prevent liquid leakage.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C until the expiry date stated on the kit label. The stability of the positive control has been validated after 6 freeze-thaw cycles. However, it is recommended to distribute in aliquots to avoid repeated freeze-thaw cycles.

- For proper use of the kit, it is recommended that unneeded wells are not rehydrated. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and stored in the foil bags provided with the silica gel inside and closed with the zip closure to avoid contact with light or moisture and stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label. Once the wells have been rehydrated, nucleic acid addition and RT-qPCR should be performed immediately.
- Once opened, the Resuspension buffer, PCR grade water and Negative Control components should be stored at 2-40°C for the shelf life indicated on the kit label.
- Keep all reagents in the darkness.

Summary

Japanese encephalitis (JE) virus is an enveloped RNA virus of the genus *Flavivirus*, family Flaviviridae (ECDC Factsheet Japanese Encephalitis, Mar2022). JE virus exists as one phenotype and five distinguishable genotypes (Roberts A. et al, 2020). JE virus is closely related to West Nile and St. Louis encephalitis viruses and is the leading cause of vaccine-preventable encephalitis in Asia and the western Pacific (CDC Japanese Encephalitis Virus, Dec2023). 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 (CDC Japanese Encephalitis Virus Transmission, Dec2022).

Japanese encephalitis virus is a mosquito-borne virus spread by the bite of carrier *Culex* mosquitoes, mainly *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex vishnui* mosquitoes (Sharma KB. et al., 2021). The virus is maintained in a zoonotic cycle between mosquitoes (the vector) and vertebrate hosts, primarily pigs and wading birds (also referred to as amplifying hosts or natural reservoirs). 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 (CDC Japanese Encephalitis Virus Transmission, Dec2022) (Roberts A. et al, 2020).

Most people infected with JE do not have symptoms or have only mild symptoms. However, a small percentage of infected people develop inflammation of the brain (encephalitis), with symptoms including headache, fever, disorientation, seizures, weakness, and coma. About 1 in 4 cases are fatal (CDC Japanese Encephalitis Virus, Dec2023). On average, 1 in 250 infected people develops a severe neuroinvasive illness. The incubation period is usually 5 to 15 days (ECDC Factsheet Japanese Encephalitis, Mar2022).

According to JEV statistics given by WHO in 2019, 24 countries in South-East Asia and Western Pacific regions have endemic JEV transmission, which exposes 3 billion people to the risk of infection (Roberts A. et al, 2020). A literature review estimates nearly 68 000 clinical cases of JE globally each year, with approximately 13 600 to 20 400 deaths (WHO Japanese Encephalitis, May 2019). The case-fatality rate among those with encephalitis can be as high as 30%, more so in children. Permanent neurologic or psychiatric sequelae can occur in 30-50% of cases (Roberts A. et al, 2020).

The detection of JEV infection is problematic due to the short duration of viraemia and the asymptomatic nature of infection (Roberts A. et al, 2020). The diagnosis of Japanese encephalitis virus infection relies on the detection of specific IgM antibodies that are present in the cerebrospinal fluid and serum of patients and confirmation by neutralization assays. Diagnosis of JEV could be performed also by viral direct detection by RT-PCR performed on blood or cerebrospinal fluid from patients in the early phase of the disease (ECDC Factsheet Japanese Encephalitis, Mar2022).

Test principle

Vitassay qPCR Japanese Encephalitis is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the NS5 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.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

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 detection channels of the target sequences are described as follows:

Target	Detection Channel
NS5 gene (Japanese encephalitis virus)	FAM
Internal Control (IC)	HEX, VIC, or JOE (depending on the equipment used)

Precautions

- For professional in vitro diagnostic use.
- Do not use the kit after the expiration date.
- Do not use the kit without having read and understood the information on procedures, precautions, and limitations provided in the instructions for use.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if the package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Use the strips immediately after removing the protective foil to protect the reaction mixture from sunlight. It is not recommended to leave the strips open without resuspending. Once the required wells have been rehydrated, the qPCR assay should be performed immediately.
- It is recommended to cut the required/necessary wells before removing the protective seal from the entire strip. Store the rest inside the bag with the desiccant.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (do not remove the desiccant from the pouches). Remove excess air from the bags before sealing.
- Do not use the product near solvents to avoid deterioration of the label.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Rehydrate the vial immediately after opening the Positive Control envelope and use it in the PCR reaction or store it properly. Leaving the vial open without resuspending may cause deterioration of the reagent.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area. Once the test is completed wash your hands thoroughly.
- 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. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended. A new tip should be used for each sample. It is necessary to change gloves before handling the reagents.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- The product Vitassay qPCR Japanese Encephalitis has only been validated with the equipment mentioned in Section Compatibles real-time PCR equipment of this Instructions for Use.
- You must ensure that the conditions are set up in the thermal cycler according to the instructions in section "Programme your thermocycler".
- Refer to Safety data sheets, available on request.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

For specimen collection, conservation, and transport the conditions validated by the user must be followed. Vitassay qPCR Japanese encephalitis has been tested in blood and cerebrospinal fluid (CSF). Other sample types must be validated by the user.

Overall, clinical samples should be collected properly in clean containers with or without transport media (depending on sample type), labelled correctly and be processed as soon as possible to guarantee the test quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. Blood samples should be transported at 4°C for 24 hours. For longer transport (more than 24 hours), shipment at -20°C or below is recommended (Yong W., 2019). Blood samples can be stored at 4°C for up to 24 hours or frozen at -20°C or

lower (ideally at -80°C) for conservation during a long time. In the case of CSF samples, they should be stored frozen at -20°C or lower (ideally at -80°C). Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Yong W. (eds) Biobanking. Methods in Molecular Biology, vol 1897 (2019) Humana Press, New York, NY.

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. Follow the manufacturer's instructions for use. The assay has been validated with the following extraction kits:

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek).

For the use of RNA extraction kits other than those mentioned above, validation must be performed by the end user, following the manufacturer's instructions for use.

It should be noted that the positive and negative control should not be extracted. To monitor and control the extraction process and rule out possible contamination, a sample blank (not supplied in the kit) can be extracted, which should consist of the same matrix as the clinical samples (real or simulated matrix), and previously characterized as negative for all targets.

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Japanese Encephalitis Positive Control (red tube) with the 400 μL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C .

This component contains a high-copy number template and entails a very significant contamination risk. Therefore, we recommend opening and manipulating it in a separate area of the laboratory 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.
It is recommended not to rehydrate wells that are not needed. Unused wells can be easily cut before removing the protective foil and stored as indicated in the Transport and Storage Section.
- Peel off the protective aluminium seal from the strips to be used.
- Pipette 15 μL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 μL of RNA extracted from each sample, of negative control (yellow tube) and of reconstituted positive control (red tube) and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the optical caps provided. It is recommended spin down briefly.
- 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 annealing/extension step (*) through the FAM (Japanese Encephalitis virus) and HEX, JOE, or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is performed by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control signal emission.

For each assay, it is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. To do so, select the well corresponding to the positive control for each channel and set the threshold value within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). In case a threshold is set automatically by the equipment used, check, and verify that it is adjusted to the positive control or adjust it manually. Once the threshold value is set, the test samples can be interpreted.

The chemical nature of the different fluorophores can affect the threshold value of the channels, just as different signal intensities can influence the threshold value for different instruments.

In addition, it is recommended to include a blank (confirmed negative sample from the same matrix as the samples tested) for the detected targets to establish the baseline of the assay.

For a valid diagnostic test run, before analyzing the result of the clinical samples, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct ≤40) in FAM (Japanese Encephalitis), which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show the absence of signal (Ct >40 or no signal) in FAM (Japanese Encephalitis) which validates the reaction.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in the positive control and negative control wells.

The experiment is invalid if there is no signal in the positive control or is amplification signal in the negative control, except for the HEX, JOE or VIC channel which should show amplification signal (corresponding to Internal Control). In either case, the assay must be repeated.

Once the results of the controls have been validated, for the interpretation of the sample results **select only the channels where the targets are detected**. The result interpretation is summarized in the following table:

Negative Control	Positive Control	Japanese Encephalitis FAM	Internal Control HEX	Interpretation
-	+	+	+/- ¹	Japanese Encephalitis RNA Detected
-	+	-	+ ²	Japanese Encephalitis RNA Not detected ²
-	+	-	- ²	Invalid ²

(+) Positive: Amplification signal (Ct ≤40)

(-) Negative: No amplification signal (Ct >40 or no signal)

¹ Sometimes, in the case of clinical samples, detection of the internal control is not necessary as the presence of a high initial copy number of the target nucleic acid may cause preferential amplification of the target nucleic acid. The internal control (IC) either shows or does not show an amplification signal (Ct ≤40 or no signal).

² In case the Japanese Encephalitis target genes are negative, the Internal Control should show an amplification signal with Ct ≤ 35. In case of no signal or Ct value > 35 of the internal control, the result is considered "invalid" and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR by diluting the RNA sample 1:10 and/or 1: 100, or to re-extract and repeat the assay to check for possible failure of the extraction procedure and/or inhibition problems.

If the result obtained is unclear or doubtful, it is necessary to check that all steps have been performed correctly, verify the correct performance of each RT-qPCR step, check all parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity. If the situation is not resolved, it is recommended to repeat the test preferably in duplicate depending on the available material: (a) obtain a new specimen, re-extract, and re-test (ideal), (b) re-extract and re-test another aliquot of the same sample, or (c) repeat the RT-qPCR with the same isolated RNA sample.

The test results should be evaluated by a healthcare professional, in the context of the medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

Quality Control

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 high agreement to detect Japanese encephalitis virus.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Japanese Encephalitis cDNA template (from 10^7 to 10^1 copies/reaction). This assay has a detection limit of ≥ 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 observed between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<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, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

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

- 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)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I

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

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

For more information regarding thermocycler compatibility based on bibliographic data and the most common detection channels contact the manufacturer (info@vitassay.com).

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

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

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 nucleic acids from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Possible crosstalk phenomena might be observed in empty channels of the thermocycler (if there is no target to be detected), therefore, when interpreting the results, it is necessary to select only those channels where the targets amplify.
- Occasionally, target template nucleic acids with a copy number below the detection limit can be detected, but the results may not be reproducible.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. It is not possible to correlate the Ct values obtained in the PCR with the concentration of the sample, as these depend on the thermal cycler used and the run itself. This is a qualitative test.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Japanese Encephalitis, either by the positive control reconstitution, by samples containing high concentrations of target nucleic acids or contamination due to PCR products from previous reactions.

- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including nucleic acids extraction); c) nucleic acids degradation during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) microorganism load is below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures; g) mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect the detection of new or unknown strains.
- The detection of nucleic acids does not imply the presence of viable and/or infectious microorganisms or that these microorganisms are the causative agents of clinical symptoms.
- Negative results do not preclude Japanese encephalitis infection and should not be the sole basis for a patient management/treatment decision. The optimal specimen types for Japanese encephalitis identification and/or the most appropriate stage of infection for collection have not yet been established. Consider collecting multiple samples from the same patient at different times, which may increase the likelihood of detecting the microorganism(s).
- If the patient's clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible infection by these microorganisms, and other diseases have been discarded, a false negative result might not be dismissed, and additional tests should be performed.
- The fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment (even if it is the same model), extraction system, sample type, and pretreatment, among others.
- The Positive Control and Negative Control must not be extracted.
- It is recommended to include a sample blank during the extraction and RT-qPCR process to rule out possible contamination and to avoid missing probable false positive results.
- The use of an appropriate control material such as reference RNA or viral RNA particles is recommended to control the reverse transcription step. These controls are not included in the kit.
- Detection of some circulating genotypes belonging to genotype IV (GIV) of JEV may be compromised.

Bibliography/Bibliografia












1. “Centers for Disease Control and Prevention (CDC), “Japanese Encephalitis”, 07 December 2023. Website: www.cdc.gov/japaneseencephalitis/index.html.
2. Roberts A., Gandhi S. (2020). Japanese encephalitis virus: a review on emerging diagnostic techniques. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, 25(10), 1875–1893.
3. Sharma KB, Vrati S, Kalia M. (2021) Pathobiology of Japanese encephalitis virus infection. *Mol Aspects Med.* Oct;81:100994.
4. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), “Factsheet about Japanese Encephalitis”, 16 March 2022. Website: www.ecdc.europa.eu/en/japanese-encephalitis/facts.
5. World Health Organization (WHO). Japanese Encephalitis, 09 May 2019. Website: [Japanese encephalitis \(who.int\)](http://japanese-encephalitis.who.int)
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Japanese Encephalitis Virus Transmission, 07 December 2022. Website: <https://www.cdc.gov/japaneseencephalitis/transmission/index.html>

Trademarks/Marcas registradas

All trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Todas las marcas comerciales que puedan aparecer en este prospecto pertenecen a sus respectivos propietarios.

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code (yyyy-xxx) <i>Número de lote (yyyy-xxx)</i>		Use by (yyyy-mm-dd: year-month-day) <i>Fecha de caducidad (yyyy-mm-dd: año-mes-día)</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	CE marking <i>Marcado CE</i>								

Change Control / Control de cambios		
Version Nº / Versión Nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original version / <i>Versión original</i>	05/06/2019
01	General update. Resuspension buffer changed from 1mL to 1.8mL / <i>Actualización general. Cambio Resuspension buffer de 1mL a 1,8mL</i>	08/06/2020
02	New format, editorial improvement and better explanation of some sections, more information regarding material, reagents, transport and conservation, bibliographic information update, addition of some precautions, recommendations, clarifications and limitations, error corrections, Positive control rehydration procedure update, deletion of Attached I and II / <i>Nuevo formato, mejora editorial y mejor explicación de algunas secciones, más información sobre el material, los reactivos, el transporte y la conservación, actualización de la información bibliográfica, adición de algunas precauciones, recomendaciones, aclaraciones y limitaciones, corrección errores, actualización del procedimiento de rehidratación de control positivo, supresión de los Anexos I y II.</i>	01/02/2024

Real-Time PCR Kits



VA Vitassay

identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.00