

Vitassay qPCR

Zika + Dengue + Chikungunya

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los virus Zika, Dengue y Chikungunya en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Zika, Dengue and Chikungunya virus in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya, permite la detección y diferenciación de los virus del Zika, Dengue y chikungunya mediante RT-PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por el virus del Zika, Dengue y/o Chikungunya.

Referencias

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya 4x8 -well strip, low profile 7041005

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya 4x8-well strip, high profile 7042005

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S005/ 7042S005	Zika+Dengue+Chikungunya Virus strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C005	Zika+Dengue+Chikungunya Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos de congelación y descongelación, se recomienda separar en alícuotas.
- Conservar los reactivos en la 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 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

Los virus del Zika (ZIKV), Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV) son patógenos que se transmiten a través de la picadura del mismo mosquito del género *Aedes*.

El virus del Zika fue aislado en 1947 de un mono Rhesus en el bosque de Zika en Uganda. Normalmente, las manifestaciones clínicas de ZIKV humano son similares a otras derivadas de infecciones por arbovirus y que pueden ocurrir sin complicaciones graves incluyendo enfermedad febril autolimitada, artralgia, mialgia, dolor de cabeza y erupción maculopapular. Conjuntivitis, dolor ocular retroorbital, linfadenopatía así como diarrea también se han reportado.

El virus Dengue provoca una enfermedad viral grave. Los síntomas iniciales pueden variar desde fiebre asintomática hasta complicaciones como fiebre hemorrágica y shock. Aunque los síntomas más comunes son fiebre aguda alta, dolor muscular y articular, mialgias, erupción cutánea, episodios hemorrágicos y shock circulatorio.

El virus Chikungunya se aisló en primer lugar en Tanzania en 1953. Los virus Chikungunya causan una artralgia severa, debilitante y a menudo crónica con altas tasas de ataques, dando lugar a una morbilidad severa y grandes costes económicos para las comunidades afectadas.

Estos tres virus presentan un cuadro clínico similar en las etapas iniciales de la infección, aunque el tratamiento de cada una de ellas es diferente, es por eso que, una detección precoz y diferenciación es crucial. La confirmación e identificación de estas infecciones se basa principalmente en la detección de RNA viral en suero y orina mediante retrotranscripción y posterior amplificación (RT-PCR). De hecho, la serología no se aconseja debido a que esta técnica puede dar lugar a reacciones cruzadas entre los anticuerpos de estos arbovirus.

Principio del test

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de la zona del gen *envelope* del virus Zika, de la región 3' no codificante del virus Dengue y del *NSP1* del virus Chikungunya. 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 Zika+Dengue+Chikungunya, 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. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM (Dengue), Cy5 (Zika) y ROX (Chikungunya) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en los laboratorios.
- 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).

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

Preparación del control positivo

Reconstituir el Zika+Dengue+Chikungunya Positive Control (tubo rojo) liofilizado con 100 µL de PCR grade water suministrado (tubo blanco). Mezclar bien con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar varios 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.

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) en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de RNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) 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:

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 (*) a través de los canales FAM (Dengue), Cy5 (Zika) y ROX (Chikungunya) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR 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 virus de Zika (Cy5), Dengue(FAM) y Chikungunya (ROX).

Control negativo El control negativo incluido en cada serie, debe mostrar la ausencia de señal de FAM, ROX y Cy5.

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:

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

+ 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

Un total de 17 muestras de suero provenientes de pacientes con sospecha de infección por el virus del Dengue fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya y RealStar® Dengue RT-PCR Kit (Altona Diagnostics). El virus del Dengue fue detectado en 5 muestras mediante ambos tests correctamente.

Un total de 4 muestras clínicas de muestras procedentes de un panel de Zika de la organización INSTAND del año 2016 se evaluaron mediante PCR a tiempo real utilizando Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya. El virus Zika fue detectado correctamente en las 3 muestras positivas mediante el test Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya.

Doce muestras del panel del virus del Dengue de QCMD 2014 y 10 muestras del panel de Chikungunya de QCMD del 2015 fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya. Se obtuvo una concordancia del 100% para ambos paneles comparando los resultados con el informe de QCMD.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los virus de Zika, Dengue y Chikungunya utilizando Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya.

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 virus Zika, Dengue y Chikungunya fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes virus, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Zika	Dengue	Chikungunya
Chikungunya S27 Petersfield	Chikungunya S27 Petersfield	Zika MR 766
Dengue 1 Hawaii	Zika MR 766	Dengue 1 Hawaii
Dengue 2 New Guinea C	St Louis Encephalitis 17D	Dengue 2 New Guinea C
Dengue 3 virus H87	West Nile H160/99	Dengue 3 H87
Dengue 4 virus H241	West Nile Heja	Dengue 4 H241
St Louis Encephalitis 17D	West Nile Ug37	St Louis Encephalitis 17D
West Nile H160/99	Yellow Fever 17D	West Nile H160/99
West Nile Heja		West Nile Heja
West Nile Ug37		West Nile Ug37
Yellow Fever 17D		Yellow Fever 17D

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya, para el virus Zika fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando Zika cepa MR 766 como molde.

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

La reactividad de Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya, para el virus Chikungunya fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield como molde.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya, ha sido probado en los siguientes equipos:

- LightCycler 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

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.

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 Zika, Dengue y/o Chikungunya. 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 y orina. 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 en la siguiente lista, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen
Rotor-Gene®
Cepheid
SmartCycler®

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

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	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Intended use

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya allows the detection and differentiation of Zika virus, Dengue virus and Chikungunya virus by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Zika virus, Dengue virus and/or Chikungunya virus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya 4x8 -well strip, low profile 7041005

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya 4x8-well strip, high profile 7042005

Materials/reagents provided

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S005/ 7042S005	Zika+Dengue+Chikungunya Virus strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C005	Zika+Dengue+Chikungunya Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1 mL
7003N	Negative control	yelow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, we recommend to separate in aliquots.
- Keep all reagents of in the dark.

Additional equipment and material required

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

Summary

Zika virus (ZIKV), Dengue (DENV) and Chikungunya virus (CHIKV) are transmitted by the sting of the same *Aedes* genus mosquito.

Besides, Zika virus was isolated in 1947 from a rhesus monkey in the Zika forest in Uganda. Typically, clinical manifestations of human ZIKV disease are similar to many others derived of arbovirus infections that occur without serious complications and may include a self-limiting febrile illness, arthralgia, myalgia, headache and maculopapular rash. Conjunctivitis, retroorbital eye pain, lymphadenopathy and diarrhea have also been reported.

Dengue is also an acute viral illness caused by RNA virus of the family Flaviviridae. Presenting features may range from asymptomatic fever to dreaded complications such as hemorrhagic fever and shock. Acute onset high fever, muscle and joint pain, myalgia, cutaneous rash, hemorrhagic episodes, and circulatory shock are the commonly seen symptoms.

Chikungunya virus was first isolated in Tanzania in 1953. Chikungunya virus causes severe, debilitating, often chronic arthralgia with high attack rates, resulting in severe morbidity and economic costs to affected communities.

These three arboviruses in the initial stages of the infection, cause similar clinical presentations, although the disease management is different, for that, an early detection and differentiation is crucial. Confirmation and identification of these infections is based mostly on detection of viral RNA in serum and urine by using reverse transcription PCR (RT-PCR). In fact, serology is not advised since this technique can cause cross reactivity between the antibodies of these arbovirus.

Principle of the test

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya test is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *envelope* gene (Zika virus), of the 3' Non coding region (Dengue virus) and of the *NSP1* gene (Chikungunya virus). 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 Zika+Dengue+Chikungunya 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. The amplification of the Zika virus RNA target sequence is detected through the Cy5 channel, Dengue virus RNA target in FAM channel, Chikungunya virus RNA target in ROX channel whereas the internal control (IC) 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.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the laboratories.
- 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).

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Zika+Dengue+Chikungunya Positive Control (red tube) in the 100 µL of PCR grade water (transparent tube) supplied. 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.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative controls 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.

Programm 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 Cy5 (Zika virus), FAM (Dengue virus), ROX (Chikungunya) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached 2)

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 Cy5 (Zika virus), FAM (Dengue virus) and ROX (Chikungunya), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

The experiment seems to be fail 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:

Zika Virus	Dengue Virus	Chikungunya Virus	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Zika , Dengue and Chikungunya viruses Positive
-	-	-	+	-	+	Zika, Dengue and Chikungunya viruses Negative
+	-	-	+/-	-	+	Zika Virus Positive, Dengue and Chikungunya Viruses Negative
+	+	-	+/-	-	+	Zika and Dengue Viruses Positive, and Chikungunya Virus Negative
+	-	+	+/-	-	+	Zika and Chikungunya Viruses Positive, and Dengue Virus Negative
-	+	-	+/-	-	+	Dengue Virus Positive, Zika and Chikungunya Viruses Negative
-	+	+	+/-	-	+	Dengue and Chikungunya Viruses Positive, Zika Virus Negative
-	-	+	+/-	-	+	Chikungunya Virus Positive, Zika and Dengue Viruses Negative
+	+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) **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

A total of 17 serum samples from Dengue symptomatic patients were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya and RealStar® Dengue RT-PCR Kit (Altona Diagnostics). Dengue virus was detected in 5 samples by Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya Real Time PCR.

A total of 4 clinical samples from INSTAND 2016 panel from Virus Genome Detection-Zikaviruses EQA Programme, were tested by Real Time PCR using Vitassay qPCR *Zika+Dengue+Chikungunya*. Zika virus was correctly detected in the 3 positive samples.

A total of 12 clinical samples from Dengue QCMD 2014 panel and 10 samples from Chikungunya QCMD 2015 panel were tested by Vitassay qPCR *Zika+Dengue+Chikungunya*. The results of Vitassay qPCR kit were concordant for all the samples.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Zika, Dengue and Chikungunya viruses using Vitassay qPCR *Zika+Dengue+Chikungunya*.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Zika, Dengue and Chikungunya 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 Zika, Dengue and Chikungunya virus was tested within the panel of following virus, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Zika	Dengue	Chikungunya
Chikungunya S27 Petersfield	Chikungunya S27 Petersfield	Zika MR 766
Dengue 1 Hawaii	Zika MR 766	Dengue 1 Hawaii
Dengue 2 New Guinea C	St Louis Encephalitis 17D	Dengue 2 New Guinea C
Dengue 3 H87	West Nile H160/99	Dengue 3 H87
Dengue 4 H241	West Nile Heja	Dengue 4 H241
St Louis Encephalitis 17D	West Nile Ug37	St Louis Encephalitis 17D
West Nile H160/99	Yellow Fever 17D	West Nile H160/99
West Nile Heja		West Nile Heja
West Nile Ug37		West Nile Ug37
Yellow Fever 17D		Yellow Fever 17D

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya Virus Real Time PCR for Zika virus was confirmed by the real time amplification using Zika virus strain MR 766 as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya Virus Real Time PCR for Dengue virus 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 as template.

The reactivity of Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya Virus Real Time PCR for Chikungunya virus was confirmed by the real time amplification using Chikungunya virus S27 Petersfield as template.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya has been validated on the following equipments:

- LightCycler 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® (Qiagen)
- SmartCycler® (Cepheid)

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.

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 Zika virus, Dengue virus and Chikungunya virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with serum and urine 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 Zika, Dengue and/or Chikungunya virus, 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 in the list below, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	Bio-Rad
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	Eppendorf
LightCycler®96 Real-Time PCR System	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Agilent Technologies	Stratagene / Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System	Mx3000P™ Real Time PCR System
DNA-Technology	Mx3005P™ Real Time PCR System
DTlite Real-Time PCR System	Analytik Jena Biometra
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler	TOptical
Qiagen	qTOWER 2.0
Rotor-Gene®	Abbott
Cepheid	Abbott m2000 RealTime System
SmartCycler®	BIONEER
	Exicycler™ 96
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time
	Qiagen
	Rotor-Gene®
	Cepheid
	SmartCycler®

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	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

Bibliography/Bibliografía

1. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007 Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. *Emerg Infect Dis.* 2008 Aug;14(8):1232-9.
2. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. *Virol J.* 2013 Oct 22;10:311.
3. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. Hasan S, Jamdar SF, Alalawi M, Al Ageel Al Beajji SM. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016 Jan-Feb 6(1):1-6.
4. One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. Alm E, Lindegren G, Falk KI, Lagerqvist N. *BMC Infect Dis.* 2015 Nov2;15:493.
5. Pan-dengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. Dumoulin A, Marti H, Panning M, Hatz C, Hirsch HH. *J Clin Microbiol* 2008 Sep;46(9):3104-6.
6. External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. Jacobsen S, Patel P, Schmidt-Chanasit J, Leparc-Goffart I, Teichmann A, Zeller H, Niedrig M. *J Clin Virol* 2016 Mar;76:55-65.

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