

Vitassay qPCR

Dengue

PCR en tiempo real para la detección cualitativa del virus del Dengue en muestras humanas

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



Uso previsto

Vitassay qPCR Dengue permite la detección cualitativa del virus del Dengue mediante RT-PCR en tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones producidas por el virus del Dengue.

Referencias

Vitassay qPCR Dengue 4 x 8-well strip, low profile	7041002
Vitassay qPCR Dengue 4 x 8-well strip, high profile	7042002

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S002/ 7042S002	Dengue Virus strips high/low profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C002	Dengue Virus Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

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

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

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

Resumen

La infección por el virus Dengue puede resultar asintomática en los casos leves de fiebre del Dengue. El virus del Dengue se transmite generalmente por mosquitos hembra de las especies *Aedes aegypti* y, en menor medida *Ae. albopictus*. A través de un estudio de la prevalencia del Dengue se ha estimado que, 3,9 billones de personas en 128 países están en riesgo de infección por virus Dengue.

Muchas personas pueden no experimentar síntomas durante un caso leve de fiebre del Dengue. Normalmente los síntomas aparecen de 4 a 10 días después de la picadura de un mosquito infectado. Los signos y síntomas de la fiebre del Dengue incluyen: fiebre alta, dolores de cabeza, musculares, óseos y articular, dolor detrás de los ojos. También se puede experimentar erupción cutánea, náuseas, vómitos y rara vez, sangrado de las encías y de la nariz. En algunos casos, los síntomas son peores y pueden llegar a amenazar la vida del paciente. Los vasos sanguíneos a menudo se dañan, y el recuento plaquetario en la sangre desciende.

El Dengue puede diagnosticarse mediante el aislamiento del virus, mediante test serológicos (detección de antígenos y anticuerpos) o mediante métodos moleculares. El diagnóstico de infección de Dengue ya sea leve o grave se puede llevar a cabo analizando muestras de suero durante los primeros 5 días tras la aparición de los síntomas y/o en la fase temprana convaleciente. Métodos como RT-PCR son los mayormente utilizados para detectar los genes codificados por el genoma viral durante la fase aguda en muestras de suero. Esta detección coincide con la viremia y la fase febril de inicio de la enfermedad. Es importante tener en cuenta que los métodos serológicos pueden dar reacciones cruzadas con otros flavivirus incluyendo West Nile (WNV), Virus de la Encefalitis de San Luis (SLE), Virus de la Encefalitis de japonesa (JEV) y Virus de la Fiebre Amarilla (YFV).

Principio del test

Vitassay qPCR Dengue se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de la región 3' no codificante del virus Dengue. 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 Dengue 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 Dengue se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal FAM mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

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

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de RNA

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

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Preparación del control positivo

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

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

Preparación de la reacción

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

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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 (virus Dengue) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, y

Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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

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

Control positivo

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

Control negativo

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

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

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

Virus Dengue FAM	Control Interno HEX	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Virus Dengue Positivo
-	+	-	+	Virus Dengue Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

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

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control

positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Vitassay qPCR Dengue se evaluó con los programas: QCMD 2017 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA17) y QCMD 2018 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA18). Ambos programas consistían en paneles de 10 muestras en medio de transporte positivas o no al patógeno de estudio. Vitassay qPCR Dengue detectó correctamente todas las muestras de ambos paneles.

Estos resultados indican que Vitassay qPCR Dengue muestra una alta sensibilidad y especificidad para detectar el virus del Dengue.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de virus Dengue (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 Dengue fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Dengue Virus		
Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)	Plasmodium falciparum 3D7	Virus West Nile Heja
Virus Zika cepa 11468/16(French Polynesia)	Encefalitis japonesa	Virus West Nile Ug37
Zika Virus (African)	Virus de la Encefalitis de San Luis	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D
Zika virus cepa PF13/251013-18 (Asian)	Virus West Nile cepa NY99	Trypanosoma cruzi
Virus Chikungunya S27 Petersfield		

Reactividad analítica

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

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Dengue ha sido validado en los siguientes equipos:

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

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

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

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por virus Dengue. 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 disueltas en medio de transporte. El uso de otro tipo de 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 virus Dengue, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
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
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler® 480 Real-Time PCR System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

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

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

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

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

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

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

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

Intended use

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

References

Vitassay qPCR Dengue 4 x 8-well strip, low profile	7041002
Vitassay qPCR Dengue 4 x 8-well strip, high profile	7042002

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S002/ 7042S002	Dengue Virus strips high/low profile	-	4x8-well strip
7C002	Dengue Virus Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Rehydration Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

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

Additional equipment and material required

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

Summary

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

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

Dengue can be diagnosed by isolation of the virus, by serological tests (antigen and antibodies detection), or by molecular methods. Diagnosis of acute or recent dengue infection can be established by testing serum samples during the first 5 days of symptoms and/or early convalescent phase. Methods such as one-step real time RT-PCR are now widely used to detect dengue viral genes in acute-phase serum samples. This detection coincides with the viremia and the febrile phase of illness onset. It's important to consider that serological methods have cross reactivity with other flaviviruses including West Nile virus (WNV), St. Louis encephalitis virus (SLE), Japanese encephalitis virus (JEV) and yellow fever virus (YFV).

Principle of the test

Vitassay qPCR Dengue is based on the real-time amplification of the 3' non-coding region encoded by the Dengue virus 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 Dengue virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

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

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

Procedures

Specimen collection, processing and RNA extraction

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

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

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

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

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

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

Reaction setup

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

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

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

Analysis and interpretation of results

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

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

Positive control

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

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal for Dengue virus, 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:

Dengue Virus FAM	Internal Control HEX	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Virus Dengue Positive
-	+	-	+	Virus Dengue Negative
+	+	+	+	Invalid
-	-	-	-	Invalid

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

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

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

Vitassay qPCR Dengue was evaluated with the programs: QCMD 2017 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA17) and QCMD 2018 Dengue Virus EQA programme (DENVRNA18). Both programmes consisted of panels of 10 samples in transport

medium positive or not to the studied pathogen. Vitassay qPCR Dengue correctly detected all samples from both panels.

These results indicate that Vitassay qPCR Dengue shows a high sensitivity and specificity to detect the Dengue virus.

Analytical sensitivity

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

Analytical specificity

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

Dengue Virus		
Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia)	Plasmodium falciparum 3D7	West Nile virus Heja
Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia)	Japanese encephalitis	West Nile virus Ug37
Zika Virus (African)	St Louis Encephalitis virus	Yellow Fever virus strain 17D
Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian)	West Nile virus strain NY99	Trypanosoma cruzi
Chikungunya virus S27 Petersfield		

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Dengue 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.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Dengue has been validated on the following equipments:

- LightCycler Z480, 480II (Roche)
- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)

- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTLite Real Time PCR System (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)¹
- SmartCycler® (Cepheid)¹

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

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Dengue virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with samples in transport medium. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA from clinical specimens must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- Extremely low levels of target below the limit of detection may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Dengue 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, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
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
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

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

* See Attached III to configure exposure settings.

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

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

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

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

Bibliography/Bibliografía

1. Genetic and serologic properties of Dengue 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 Dengue virus and evaluation with field-caught mosquitoes. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. *Virology.* 2013 Oct 22;10:311.
3. Detection of Dengue virus in urine. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):84-6.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue Virus (<http://www.cdc.gov/Dengue/index.html>).
5. World Health Organization. Dengue virus and potential complications (<http://www.who.int/emergencies/Dengue-virus/en/>).

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™, StepOnePlus™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.






Mx3000P™ and Mx3005™ are registered trademarks of Agilent Technologies.

Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.

Rotor-Gene® Q is a registered trademark of Qiagen.

SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid

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

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



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

www.vitassay.com