

Vitassay qPCR

Zika

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

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



Uso previsto

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

Referencias

Vitassay qPCR Zika 4 x 8-well strip, low profile	7041003
Vitassay qPCR Zika 4 x 8-well strip, high profile	7042003

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S003/ 7042S003	Zika strips	-	4 tiras de 8 pocillos
7C003	Zika 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

El virus Zika (ZIKV) es un patógeno emergente que se transmite a través de mosquitos (familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*) y que fue aislado en 1947 de un mono Rhesus en el bosque de Zika en Uganda. Se cree que el ZIKV se transmite a humanos a través de la picadura de los mosquitos *Aedes spp.* infectados. Diversos estudios han demostrado que ZIKV es endémico desde África hasta el sudeste de Asia. De hecho, en otras regiones tan sólo habían aparecido unos pocos casos de infección por ZIKV, hasta que en el año 2007 tuvieron ya lugar grandes epidemias en la Isla Yap y en los Estados Federados de Micronesia, en el Pacífico.

En humanos, la infección de ZIKV se caracteriza por fiebre media (37.8°C–38.5°C), artralgia (especialmente en las articulaciones de manos y pies), mialgia, dolor de cabeza, dolor retroorbital, conjuntivitis y erupción cutánea maculopapular. Si bien muchos casos de infección por ZIKV son asintomáticos o presentan un cuadro clínico leve, no específico, similar al ocasionado por el virus Influenza. Motivo por el cual, la infección de ZIKV puede ser diagnosticada erróneamente durante la fase aguda (virémica).

La confirmación de infección por ZIKV, a pesar de su baja viremia, se basa mayormente en la detección del RNA viral en suero mediante retrotranscripción y posterior amplificación (RT-PCR). Además, la detección serológica de los anticuerpos IgM contra Zika se puede realizar mediante ELISA, aunque no hay muchos laboratorios que tengan esta capacidad y los anticuerpos de Zika pueden presentar reacción cruzada con otros flavivirus (incluido el Dengue). Esto último dificulta el diagnóstico serológico, ya que resulta necesaria su confirmación mediante ensayos de neutralización. Por consiguiente, podría considerarse que el diagnóstico en el laboratorio es un reto al que hay que enfrentarse con la mejor aproximación posible.

Principio del test

Vitassay qPCR Zika se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada de la zona del gen *envelope* del virus Zika. 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 Zika 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 Zika 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).

EZ1 Virus Mini Kit, EZ1 instrument (Qiagen).

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Preparación del control positivo

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

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

Preparación de la reacción

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

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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 Zika) 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 Zika FAM	Control Interno HEX	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Virus Zika Positivo
-	+	-	+	Virus Zika 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

Un total de 134 muestras de sangre, suero, LCR, líquido amniótico y orina provenientes de pacientes sintomáticos fueron evaluadas mediante PCR en tiempo real utilizando: Vitassay qPCR Zika y rRT-PCR *in-house* (reportados por Lanciotti et al., 2008). El virus del Zika fue detectado en 27 muestras mediante ambos test. Además, el test Vitassay qPCR Zika detectó una muestra positiva más que rRT-PCR *in-house*.

Además, Vitassay qPCR Zika se evaluó con el programa QCMD 2018 Zika Virus EQA pilot study programme (ZIKA18). Este programa consistía en un panel de 8 muestras en medio de transporte positivas o no al patógeno de estudio. Vitassay qPCR Zika detectó correctamente todas las muestras.

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

Sensibilidad analítica

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

Zika Virus		
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	Virus Dengue 4 cepa H241	Virus West Nile Heja
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	Virus de la encefalitis de San Luis cepa 17D	Virus West Nile Ug37
Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	Virus West Nile cepa H160/99	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D
Virus Dengue 3 cepa H87		

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Zika fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando Zika MR 766 (Uganda, 1947), virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia), virus Zika cepa 11468/16 (French Polynesia), virus Zika (African) y virus Zika cepa PF13/251013-18 (Asian), como molde.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Zika 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
- 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 Zika. 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 suero, sangre, LCR, líquido amniótico 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.
- 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 Zika, 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/AriaDx 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 Fast Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Fast 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™ / CFX96™ IVD 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 System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ / CFX96™ IVD 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	
Smartcyler® 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 Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

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

References

Vitassay qPCR Zika 4 x 8-well strip, low profile	7041003
Vitassay qPCR Zika 4 x 8-well strip, high profile	7042003

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S003/ 7042S003	Zika strips	-	4 x 8-well strip
7C003	Zika 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	-	4 x 8 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

Zika virus (ZIKV) is an emerging mosquito-borne pathogen (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) that was isolated in 1947 from a rhesus monkey in the Zika forest in Uganda. ZIKV is believed to be transmitted to humans by infected *Aedes spp.* mosquitoes. Several studies have demonstrated that ZIKV is endemic to Africa and Southeast Asia. In fact, in other regions, Zika virus infections have been reported in few cases until 2007 when an epidemic of ZIKV infection in humans occurred in Yap Island and Federated States of Micronesia, in the Pacific region.

In humans, ZIKV infection is characterized by mild fever (37.8°C–38.5°C); arthralgia (notably of small joints of hands and feet); myalgia, headache; retroorbital pain; conjunctivitis; and cutaneous maculopapular rash. While many cases of ZIKV infection are asymptomatic or have a mild medical history, not specific symptoms, and/or similar to that caused by the influenza virus. Reason why, ZIKV infection can be misdiagnosed during the acute (viremic) phase.

Confirmation of ZIKV infections, despite its low viremia, is based mostly on detection of virus RNA in serum by using reverse transcription PCR (RT-PCR). Besides the serological detection of IgM antibodies against ZIKV can be detected by ELISA, although few laboratories have this ability and Zika antibodies can present cross reactivity against other *flavivirus* (including Dengue). This can difficult the serologic diagnosis since a confirmation by neutralization assays is necessary. Consequently, the laboratory diagnosis is a challenge to be faced with the best possible approximation.

Principle of the test

Vitassay qPCR Zika is based on the real-time amplification of specific conserved fragments of the *envelope* gene encoded by the Zika 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 Zika virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Zika 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).

EZ1 Virus Mini Kit, EZ1 instrument (Qiagen).

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Zika 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 (Zika 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 Zika virus in FAM channel, which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal for Zika virus in FAM channel, which validates the reaction.

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

The result interpretation is summarized in the following table:

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

(+) **Positive:** Amplification signal

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

If the negative samples do 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

Overall, 134 clinical samples from symptomatic patients were tested by Real-time PCR using: Vitassay Zika qPCR and in-house RT-PCR assay (reported by Lanciotti et al., 2008). Zika virus was detected in 27 samples by both assays. Vitassay Zika qPCR detected one more positive sample than in-house RT-PCR assay.

In addition, Vitassay qPCR Zika was evaluated with the QCMD 2018 Zika Virus EQA pilot study (ZIKA18). This programme consisted of a panel of 8 samples in transport medium positive or not to the studied pathogen. Vitassay qPCR Zika correctly detected all the samples.

These results indicate that Vitassay qPCR Zika shows high sensitivity and specificity to detect Zika virus.

Analytical sensitivity

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

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

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR Zika was confirmed by the real-time amplification using Zika virus strain MR 766 (Uganda, 1947), Zika Virus strain 11474/16 (French Polynesia), Zika Virus strain 11468/16(French Polynesia), Zika Virus (African) and Zika virus strain PF13/251013-18 (Asian) as template.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Zika has been validated on the following equipments:

- 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
- SmartCycler® (Cepheid)^I

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

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Zika virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with blood, serum, CSF, amniotic fluid 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.
- 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 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	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™/CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

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

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Smartcyler® 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 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. *Virology.* 2013 Oct 22;10:311.
3. Detection of Zika 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. Zika Virus (<http://www.cdc.gov/zika/index.html>).
5. World Health Organization. Zika virus and potential complications (<http://www.who.int/emergencies/zika-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