

# Vitassay qPCR

## Zika + Dengue + Chikungunya

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

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of Zika, Dengue and Chikungunya viruses in clinical 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 dirigido a facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los 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 1,8 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 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 a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

## Resumen

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 en 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 por primera vez 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 las diferentes secuencias diana

son detectadas en los canales 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 que se emplee).

## **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).

High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

## Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Zika+Dengue+Chikungunya 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 ciclos repetidos 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 abrirlo y manipularlo en un área del laboratorio separada de los demás 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:

<b>Etap</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
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 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 señal en el control positivo. Se recomienda repetir el ensayo.

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 102 muestras provenientes de paneles EQA fueron analizadas mediante Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya. Los resultados se compararon con los reports finales de los programas EQAs. Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya detectó 25 muestras positivas para el virus Zika, 27 muestras positivas para el virus Dengue y 29 muestras positivas para el virus Chikungunya.

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  $\geq 10$  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 (Uganda)
Dengue 1 Hawaii	Zika MR 766 (Uganda)	Zika 11474/16 (French Polynesia)
Dengue 2 New Guinea C	Zika 11474/16 (French Polynesia)	Zika 11468/16(French Polynesia)
Dengue 3 H87	Zika 11468/16(French Polynesia)	Zika Virus (African)
Dengue 4 H241	Zika Virus (African)	Zika PF13/251013-18 (Asian)
Plasmodium falciparum	Zika PF13/251013-18 (Asian)	Dengue 1 Hawaii
Encefalitis japonesa	Encefalitis japonesa	Dengue 2 New Guinea C
Encefalitis de San Luis 17D	Encefalitis de San Luis 17D	Plasmodium falciparum
West Nile H160/99	West Nile H160/99	Trypanosoma cruzi
West Nile Heja	West Nile Heja	Dengue 3 H87
West Nile Ug37	West Nile Ug37	Dengue 4 H241
Fiebre Amarilla 17D	Fiebre amarilla 17D	Encefalitis de San Luis 17D
Trypanosoma cruzi	Plasmodium falciparum	West Nile H160/99
-	Trypanosoma cruzi	West Nile Heja
-	-	West Nile Ug37
-	-	Fiebre Amarilla 17D
-	-	Encefalitis japonesa

## Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya para el virus Zika fue evaluada con las cepas Virus Zika cepa MR 766 (Uganda, 1947), Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia), Virus Zika cepa 11468/16(French Polynesia), Virus Zika (African) and Virus Zika cepa PF13/251013-18 (Asian), como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya para el virus Dengue fue evaluada con las siguientes cepas: Virus Dengue 1 cepa Hawaii, Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea C, Virus Dengue 3 cepa H87 y Virus Dengue 4 cepa H241, como molde.

La reactividad de Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya para el virus Chikungunya fue evaluada con Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield (genotipo africano) y Virus Chikungunya cepa Martinique (genotipo asiático), como molde.

## Termocicladores compatibles

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96 <sup>TM</sup> 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)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

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 causada por los 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 debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Se puede detectar un número bajo de copias del RNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los diferentes virus, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

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

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

Termocicladores con bloque de bajo perfil
<b>Agilent Technologies</b>
AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Roche</b>
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
<b>Abbott</b>
Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>Analytik Jena Biometra</b>
TOptical
qTOWER 2.0
<b>BIONEER</b>
Exicycler™ 96
<b>Bio-Rad</b>
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™ 2Real-Time PCR Detection System
<b>Cepheid</b>
SmartCycler®
<b>DNA-Technology</b>
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
<b>Eppendorf</b>
Mastercycler™ep <i>realplex</i>
<b>Qiagen</b>
Rotor-Gene® Q
<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

## Intended use

Vitassay qPCR Zika+Dengue+Chikungunya test allows the detection and differentiation of Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses 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 patient clinical data 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

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S005/ 7042S005	Zika+Dengue+Chikungunya Virus strips low/high profile	-	4 x 8-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 1,8 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

- RNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer

- Micropipettes (1-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

## Summary

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) viruses 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 diarrhoea 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 haemorrhagic fever and shock. Acute onset high fever, muscle and joint pain, myalgia, cutaneous rash, haemorrhagic episodes, and circulatory shock are the commonly seen symptoms.

Chikungunya virus was isolated in Tanzania in 1953. Chikungunya virus causes severe, debilitating and 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 viral RNA detection in serum and urine clinical samples 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 by polymerase chain reaction. The presence of the virus is detected by a fluorescence increment 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.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. Take necessary precautions during the collection, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.

## Procedures

### Specimen collection, processing and RNA extraction

For pre-treatment and RNA 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 (Stratec).

### Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Zika+Dengue+Chikungunya Positive Control (red tube) in 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After the 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 to open and to manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and clinical 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 it into each well.
- Pipette 5 µL of RNA sample, negative and positive controls and add it 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 indicated 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 control used in each run, must show an amplification in channels: Cy5 (Zika virus), FAM (Dengue virus) and ROX (Chikungunya), which validates the reaction.

#### **Negative control**

The negative control included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 channels, 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	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 do not show a positive result for the internal control, they should be retested using a dilution 1:10 from the original sample or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

## **Quality Control**

An Internal Control (IC) is included in each reaction for confirming the appropriate performance of the molecular diagnostic technique. 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 102 samples from EQA panels were analyzed using Vitassay qPCR Zika + Dengue + Chikungunya. The results were compared with the final reports of the EQAs programs. Vitassay qPCR Zika + Dengue + Chikungunya detected 25 positive samples for the Zika virus, 27 positive samples for the Dengue virus and 29 positive samples for the Chikungunya virus.

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

### **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  $\geq 10$  viral RNA copies per reaction.

### **Analytical specificity**

The analytical specificity for Zika, Dengue and Chikungunya viruses was tested within the panel of the following viruses, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Zika	Dengue	Chikungunya
Chikungunya S27 Petersfield	Chikungunya S27 Petersfield	Zika MR 766 (Uganda)
Dengue 1 Hawaii	Zika MR 766 (Uganda)	Zika 11474/16 (French Polynesia)
Dengue 2 New Guinea C	Zika 11474/16 (French Polynesia)	Zika 11468/16(French Polynesia)
Dengue 3 H87	Zika 11468/16(French Polynesia)	Zika Virus (African)
Dengue 4 H241	Zika Virus (African)	Zika PF13/251013-18 (Asian)
Plasmodium falciparum	Zika PF13/251013-18 (Asian)	Dengue 1 Hawaii
Japanese encephalitis	Japanese encephalitis	Dengue 2 New Guinea C
St Louis Encephalitis 17D	St Louis Encephalitis 17D	Plasmodium falciparum
West Nile H160/99	West Nile H160/99	Trypanosoma cruzi
West Nile Heja	West Nile Heja	Dengue 3 H87
West Nile Ug37	West Nile Ug37	Dengue 4 H241
Yellow Fever 17D	Yellow Fever 17D	St Louis Encephalitis 17D
Trypanosoma cruzi	Plasmodium falciparum	West Nile H160/99
-	Trypanosoma cruzi	West Nile Heja
-	-	West Nile Ug37
-	-	Yellow Fever 17D
-	-	Japanese encephalitis

### Analytical reactivity

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

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

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 (African genotype), and Chikungunya virus Martinique isolate (Asian genotype) as template.

## Compatibles real-time PCR equipment

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

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) <sup>II</sup>
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)<sup>I</sup>
- SmartCycler® (Cepheid)<sup>I</sup>

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 placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

## Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Zika, Dengue and Chikungunya virus infections. All the obtained results must be interpreted together with complementary 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 viruses, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
<b>Agilent Technologies</b>	<b>Abbott</b>
AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
<b>Applied Biosystems</b>	<b>Applied Biosystems</b>
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
<b>BIONEER</b>	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Exicycler™ 96	<b>Analytik Jena Biometra</b>
<b>Bio-Rad</b>	TOptical
CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	<b>BIONEER</b>
<b>Cepheid</b>	Exicycler™ 96
SmartCycler®	<b>Bio-Rad</b>
<b>Qiagen</b>	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
<b>Roche</b>	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	<b>Cepheid</b>
	SmartCycler®
	<b>DNA-Technology</b>
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	<b>Eppendorf</b>
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	<b>Qiagen</b>
	Rotor-Gene® Q
	<b>Stratagene / Agilent Technologies</b>
	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
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>ABI 7500 Applied Biosystems</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Roche Lightcycler®480II</b>	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
<b>Smartcycler® Cepheid</b>	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
<b>Abbott m2000rt</b>	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene</b>	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>AriaMx Agilent</b>	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
<b>Rotor-Gene® Q Qiagen</b>	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	
<b>Exicycler™ 96 BIONEER</b>	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:

<b>Thermocycler</b>	<b>Vitassay channel</b>	<b>Exposure values</b>
<b>DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)</b>	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
<b>DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)</b>	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. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. Hasan S, Jamdar SF, Alalawi M, Al Ageel Al Beaiji 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 Nov;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, Leparç-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](http://www.vitassay.com)