

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by **CerTest**
BIOTEC

Tropical Panel I

Handbook for the following references/
Manual para las siguientes referencias:

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile

VS-TP0112L

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile

VS-TP0112H

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile

VS-TP0113L

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile

VS-TP0113H



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific and differentiation of Zika (ZIKV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), West Nile (WNV), Yellow fever (YFV) and/or Mayaro (MAYV) viruses in clinical samples from patients with signs and symptoms of Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, Yellow fever and/or Mayaro viruses infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the ZIKV, DENV, CHIKV, WNV, YFV and MAYV in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, Yellow fever, and Mayaro viruses.

2. Summary and Explanation

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) are arthropod-borne viruses (arboviruses) that share mosquitos of the *Aedes* genus as common vector, specifically *A. aegypti* and *A. albopictus*. Environmental changes, urbanization and the globalization of travel have enhanced the spread of ZIKV, DENV and CHIKV resulting in epidemics and the co-circulation in overlapping geographic areas as well as the possibility of viral co-infection within a single host. Currently the major endemic regions include Africa, Southeast Asia, the Pacific Islands and the Americas.

Besides, these arboviruses cause similar clinical presentations, especially in the initial stages of infection (fever, headache, skin rash, muscle and joint pain, and gastrointestinal symptoms). In fact, due to neither virus possesses any specific distinguishing clinical features and the outcomes and management strategies for these three viruses are vastly different, an early and accurate diagnosis is imperative.

Therefore, ZIKV, DENV and CHIKV must be initially included in the differential diagnosis for a patient with suspicious clinical symptoms who is living in or returning from travel to an endemic area. Laboratory diagnostic tests are based on the detection of the virus, viral components (antigens or nucleic acid), or the host immunologic response to the virus. However, due to the cross-reactivity of the antibodies of these arboviruses limits the use of serology, Real Time RT-PCR is a detection method commonly used during the acute phase of the infection. In order to do that, clinical specimens that can be tested including blood, serum, plasma, urine and others.

West Nile virus (WNV) is considered the most important causative zoonotic pathogen of viral encephalitis worldwide. WNV belongs to the genus *Flavivirus* and is a member of the Japanese encephalitis serogroup. Phylogenetic analysis has revealed two main lineages of WNV, lineage 1, which is widely distributed and further subdivided in three clades (A, B and C) and lineage 2. While several additional lineages have been proposed during the last years.

In nature, there is an enzootic transmission cycle of WNV between birds (hosts) and mosquitoes (bridge vectors) of the genus *Culex* (mainly *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* and *Cx. modestus*) and *Aedes*. But this virus can infect other vertebrates and humans, between which it has been reported additional methods of transmission: blood transfusion, organ transplantation, transplacental transmission, and via breastmilk. Most human infections with WNV (~80%) are asymptomatic or characterized by a mild-febrile syndrome and flu-like malaise. Nevertheless,



fewer than 1% infection may progress to more severe neuroinvasive disease (WNND) and even death, depending on the host immune response and the viral strain. WNND usually encompasses three different syndromes: encephalitis, meningitis, and acute flaccid paralysis.

Laboratory diagnosis is generally accomplished by testing of serum or cerebrospinal fluid (CSF) to detect WNV-specific IgM antibodies and confirmed by plaque-reduction neutralization tests (PRNTs). However, the cross-reactivity with infections caused by other flaviviruses remains the major problem with most serological diagnostic tests. In this regard, different PCR-based protocols have been developed to detect viral RNA and can be performed on serum and CSF, both collected early in the course of illness, and additional tissue specimens as urine, where it can be detected much longer and at higher concentrations.

Yellow fever virus (YFV) is an RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family. The "yellow" in the name refers to the jaundice caused by liver involvement that affects some patients. Yellow fever is an acute viral haemorrhagic zoonotic disease transmitted between humans and from monkeys to humans by mosquitoes, primarily by *Aedes (aegypti)* and *Haemogogus*.

The incubation period is generally 3–6 days from infection until illness. Many people do not experience symptoms, but when these do occur during acute febrile phase patients could develop myalgia, headache, back pain, anorexia, nausea, and sometimes vomiting; symptoms typically resolve within 1 week. Small proportions of patients enter a second, more toxic phase within 24 hours of recovering from initial symptoms, and develop severe symptoms (with high fever, jaundice, bleeding, and kidney damage). Half of the patients who enter this toxic phase die; due to there is currently no specific anti-viral drug. Although, specific care to treat dehydration, liver and kidney failure, and fever improves outcomes. Therefore, vaccination and mosquito control are the most important means of preventing yellow fever.

Yellow fever is difficult to diagnose, especially during the early stages. It can be confused with severe malaria, leptospirosis, viral hepatitis (especially the fulminating forms of hepatitis B and D), other hemorrhagic fevers, infection with other flaviviruses (Dengue, Zika and West Nile viruses), and poisoning.

Usually, the detection of yellow fever virus is carried out by virus cultivation on susceptible cells followed by immunofluorescence, ELISA, immunohistochemical examination or PCR. For quantifying the load of infectious particles in cell culture or serum samples, plaque assay is still the commonly used method. However, this is cumbersome and time-consuming technique. With the recent development of Real-Time PCR, a rapid and accurate alternative to quantify viral load in blood is available.

Mayaro virus (MAYV) is an enveloped, single-stranded positive RNA virus which belongs to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*. Its transmission cycle is thought to occur mainly through mosquito vectors, especially those of genus *Haemagogus*, but *Aedes* spp. mosquitoes may also be competent vectors. These vectors transmit the virus to primates and birds and sometimes to humans.

Phylogenetic studies using a fragment of the structural polyprotein open reading frame suggest the classification of MAYV in 2 different genotypes: D (includes isolates from all countries) and L (contains strains detected only in Brazil).




The disease caused by Mayaro lasts for 3-5 days and includes fever, headache, rash, myalgia, arthralgia and, occasionally, arthritis, which can be very debilitating and can persist for months. This symptomatology is quite similar to other arthropod-borne virus, being sometimes clinically indistinguishable from Dengue, Chikungunya fever, malaria, rabies, measles or other arboviral diseases, so it is required to use a reliable and specific test to avoid this misdiagnosis.

This Real Time PCR Detection Kit enable a reliable diagnosis of Mayaro virus by the amplification of the *nsp1* gene, which has been shown to be the best target for detection due to its highly conserved sequences. Because MAYV is blood-borne and mosquito-transmitted, blood is the usual human sample collected. Serum and plasma are prepared from this and used to determine Mayaro infection.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, Yellow fever and/or Mayaro viruses in clinical samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of specific genes using specific primers and a fluorescent-labelled probes (Table 1, Pathogens detected in each reaction tube and target genes).

Tropical Panel I 8-well strip contains in each reaction well the following reaction mixes for the detection of the specific targets (Table 1):



	Code	Controls	Reaction mix placed into each well Pathogens and target genes
1	ZDC	IC	Zika, Dengue & Chikungunya
			Zika (<i>envelope gene</i>), Dengue (3'Non coding region) and Chikungunya (<i>NSP1 gene</i>)
2	WNV	IC	West Nile Virus
			West Nile Virus (a conserved sequence of genomic region 5'UTR)
3	FEV	IC	Yellow Fever
			Yellow Fever (a conserved sequence of genomic region 5'UTR)
4	MYV	IC	Mayaro Virus
			Mayaro Virus (<i>nsp1 gene</i>)

Table 1. *Tropical panel I* 8-well strips provided in VIASURE *Tropical panel I* Real Time PCR Detection Kit. Reaction mix placed into each well, pathogens detected and target genes. IC: Internal control. Note that the first reaction mix is placed into the ends of the strip.



VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal which is proportional to the quantity of the target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each RNA targets are amplified and detected in specific channels (FAM, HEX, ROX, and/or Cy5) and the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2)(Table 5).

4. Reagents provided

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 2 and Table 3:

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Tropical Panel I</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Tropical Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	6/12 X 8-cap strip

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-TP0112L and VS-TP0112H.

Reagent/Material	Description	Color	Amount
<i>Tropical Panel I</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Tropical Panel I</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 X 8-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-TP0113L and VS-TP0113H.



5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

To check thermocycler compatibility, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from sunlight.

7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (if available, Ref. VS-TP0113L and VS-TP0113H). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.



- Do not mix reagents from different envelopes and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- **Note that the first reaction mix is placed into the ends of the strip.**
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. 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.
- Consult safety data sheets, upon request.

8. Test procedure

8.1. RNA extraction

Perform the sample preparation following the manual system protocol or according to the recommendations appearing in the instructions for use of extraction kit used.

For RNA extraction from clinical samples (blood, serum, plasma, urine, tissues and others) you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions for use. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey Nagel).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- NX-48 Viral NA Kit, using the Nextractor® NX-48 system (Genolution).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- ZP02003 MagPurix Viral Nucleic Acid Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- ZP02013 MagPurix Viral RNA Extraction kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)

8.2. Lyophilized positive control

Tropical Panel I Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized



Tropical Panel I Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

8.3. PCR protocol

Determine and separate the number of required strips, including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plate or strips. **Note that the first reaction mix is placed into the ends of the strip (Table 1) and each strip includes two *Tropical Panel I* reactions, wells 1 to 4: ZDC, WNV, FEV and MYV reaction mixes).**

- 1) Reconstitute the number of strips you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted *Tropical Panel I* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in the 8 wells of each strip and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:


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

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM, ROX, Cy5 and/or HEX (JOE or VIC) channels following Table 5. Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2).

The reaction mixes placed in each well of *Tropical Panel I* strip allow the detection of the specific target pathogens in the following channels (Table 5).





	Code	Channels			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ZDC	Dengue Virus	Internal Control	Chikungunya virus	Zika virus
2	WNV	West Nile virus	Internal Control	-	-
3	FEV	Yellow Fever	Internal Control	-	-
4	MYV	Mayaro Virus	Internal Control	-	-
4	MYV	Mayaro Virus	Internal Control	-	-
3	FEV	Yellow Fever	Internal Control	-	-
2	WNV	West Nile virus	Internal Control	-	-
1	ZDC	Dengue Virus	Internal Control	Chikungunya virus	Zika virus

Table 5. Pathogens identified in each detection channel.

9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative controls of each well from *Tropical Panel I* reaction(4 wells) and the presence of signal for *Tropical Panel I* positive control of each well from *Tropical Panel I* reaction (4 wells). Check Internal Control signal (ZDC, WNV, FEV and MYV reaction mixes) to verify the correct functioning of the amplification mix.. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer’s instructions.

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the Internal Control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

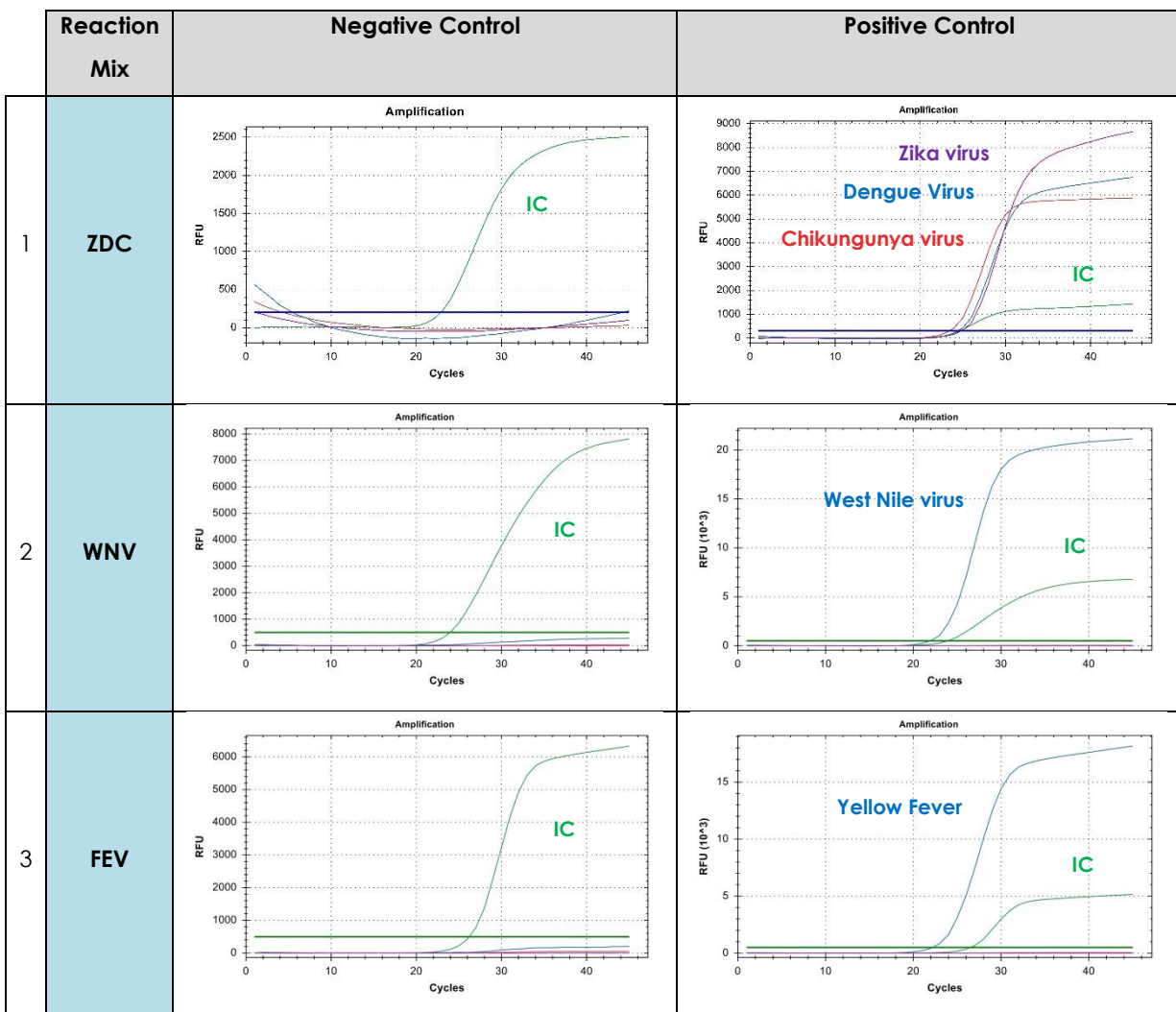
A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the Internal Control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control (if available).

Using the following table read and analyze the results:



	Reaction Mix	Pathogens	Channels			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ZDC	Dengue Virus	Positive			
		Chikungunya virus			Positive	
		Internal Control		Positive/Negative		
		Zika virus				Positive
2	WNV	West Nile virus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
3	FEV	Yellow Fever	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		
4	MYV	Mayaro Virus	Positive			
		Internal Control		Positive/Negative		

Table 6. Sample interpretation. Positive: Amplification curve. Empty: No amplification curve.



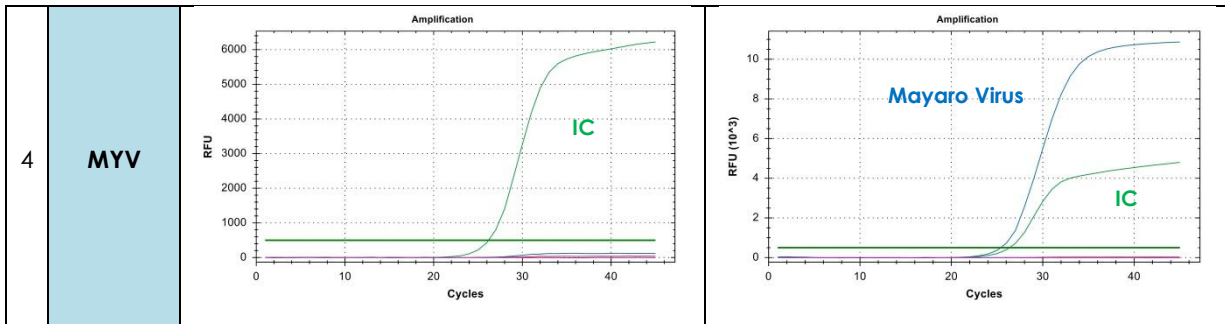


Table 7. Correct run of negative and positive controls run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative controls or absence of signal in the positive wells. We recommend to repeat the assay again.

In case of absence of internal control signal in sample wells, we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated with RNA extracted from serum and urine samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples 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 might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, Yellow fever and/or Mayaro viruses either by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.



12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit (for **Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix**) was evaluated with samples from INSTAND and QCMD programs. The clinical performance of VIASURE assay was tested using 102 clinical specimens. The results were compared with the final EQA Reports:

	EQA Reports			
		+	-	Total
Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix	+	25	0	25
	-	1	76	77
	Total	26	76	102

Table 8. Comparative results for Zika Virus

	EQA Reports			
		+	-	Total
Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix	+	27	0	27
	-	3	72	75
	Total	30	72	102

Table 9. Comparative results for Dengue Virus

	EQA Reports			
		+	-	Total
Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix	+	29	1	30
	-	2	70	72
	Total	31	71	102

Table 10. Comparative results for Chikungunya Virus

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit (for **West Nile Virus**) was evaluated with QCMD 2014, 2016, 2017 and 2018 panels from West Nile Virus RNA EQA Programme and with INSTAND e.V.'s Virus Genome Detection – West Nile Virus 2016 and 2017. These panels consist of 64 clinical specimens dissolved in transport medium. The results were compared with those presented by EQA programme final reports. All West Nile Virus (47/64) samples could be detected. Samples contained different dilutions of West Nile Virus strains NY99 (lineage 1), Ug37 and Heja (lineage 2). In addition, WNV Negative and Non-WNV flaviviruses samples (which include Japanese Encephalitis virus/Dengue virus types 1-4/ Tick borne Encephalitis virus/ Yellow Fever virus/Zika virus) could be confirmed as a negative.

The clinical performance of VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit (for **Yellow fever virus**) was evaluated using Tropical Virus panels (Chikungunya, Dengue, Zika and West Nile Viruses) from QCMD for several years (2014, 2015, 2016 and 2017). These QCMD panels included 9 positive samples for yellow fever virus. The results were compared with the programs final reports. Other Tropical Virus including Dengue Virus Type 1, Dengue Virus Type 2, Dengue Virus Type 3, Dengue Virus Type 4, Zika Virus, Chikungunya Virus, Japanese Encephalitis virus, West Nile Virus (strains NY99 and Heja), and Tick borne Encephalitis virus, were not detected.

The results show a high sensitivity and specificity to detect Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile and Yellow fever viruses using VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit.



12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction for Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, Yellow fever and/or Mayaro.

12.3. Analytical specificity

The specificity of the Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, Yellow fever and/or Mayaro viruses assays were confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common arbovirus. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested, except the targeted pathogens of each assay.

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

Table 11. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit for **Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix**, was evaluated against Zika virus (Zika virus 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), Dengue Virus (Dengue 1 virus strain Hawaii, Dengue 2 virus strain New Guinea C, Dengue 3 virus strain H87 and Dengue 4 virus strain H241) and Chikungunya Virus (Chikungunya virus S27 Petersfield and Chikungunya virus Martinique isolate (Asian genotype)), showing positive results.

The reactivity of VIASURE **West Nile Virus Reaction mix** was evaluated against West Nile virus H160/99, Heja,Ug37 and NY99, showing positive results.

The reactivity of VIASURE **Yellow Fever Virus Reaction mix** was evaluated against Yellow Fever virus strain 17D, showing positive results.



ANNEX 1

COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁴⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁴⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁴⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Select Ramp Speed "Standard".
 (2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.
 (3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.
 (4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.
 (5) No detection in Cy5 channel.
 (6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



ANNEX 2

DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation is 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 for ROX must be 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	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10)
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



ANNEX 3

OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

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



ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la detección y diferenciación específica de los virus Zika (ZIKV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), West Nile (WNV), fiebre amarilla (YFV) y/o Mayaro (MAYV) en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por los virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, fiebre amarilla y/o Mayaro. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por los ZIKV, DENV, CHIKV, WNV, YFV and MAYV en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El RNA es extraído a partir de las muestras clínicas, posteriormente el DNA complementario es sintetizado en un solo paso y amplificado mediante PCR a tiempo real. La detección se lleva a cabo utilizando oligonucleótidos específicos y sondas marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar los virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, fiebre amarilla y Mayaro.

2. Introducción y explicación

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) y Chikungunya (CHIKV) son virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que tienen como vector común los mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, específicamente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. La diseminación de estos virus se ve favorecida por el cambio climático, la urbanización y la globalización, provocando epidemias, cocirculación en las mismas áreas geográficas, así como la posibilidad de co-infección viral dentro de un único huésped. Actualmente las principales regiones endémicas son África, el sudeste de Asia, las islas del Pacífico y Centro-Sur América.

Además, estos arbovirus causan cuadros clínicos similares, especialmente en las etapas iniciales de la infección (fiebre, dolor de cabeza, erupciones en la piel, dolor muscular y articular y síntomas gastrointestinales). Un diagnóstico precoz y preciso es imprescindible debido a que comparten el mismo cuadro clínico y el manejo de la infección es diferente para cada uno de ellos.

Por lo tanto, es importante realizar un diagnóstico diferencial para ZIKV, DENV y CHIKV en un paciente con síntomas clínicos sospechosos que viva o que haya viajado a un área endémica. Las pruebas de diagnóstico se basan en la detección del virus, componentes virales (antígenos o ácido nucleico), o en la detección de la respuesta inmunológica del huésped al virus. Sin embargo, la Serología tiene un uso limitado, debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos a estos arbovirus. La RT-PCR a tiempo real en cambio es un método de detección útil durante la fase aguda de la infección en muestras clínicas incluyendo sangre, suero, plasma, orina y otros.

El virus del Nilo occidental (West Nile Virus, WNV) se considera el patógeno zoonótico causal más importante de encefalitis viral en todo el mundo. WNV pertenece al género *Flavivirus* y al serocomplejo de la encefalitis japonesa. El análisis filogenético ha revelado dos principales linajes de virus del Nilo Occidental, el linaje 1, ampliamente distribuido, el cual se subdivide en tres subtipos (A, B y C) y el linaje 2. Si bien, durante los últimos años se han sugerido varios linajes adicionales



En la naturaleza, hay un ciclo de transmisión enzoótica del virus del Nilo Occidental entre las aves (huéspedes) y los mosquitos (vectores puente) del género *Culex* (principalmente *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* y *Cx. modestus*) y *Aedes*. Sin embargo este virus puede infectar otros vertebrados y a los seres humanos, entre los cuales se han reportado otros métodos de transmisión adicionales: transfusión de sangre, trasplante de órganos, la transmisión transplacentaria y a través de la leche materna. La mayoría de las infecciones humanas con virus del Nilo Occidental (~ 80%) son asintomáticas o se caracterizan por un cuadro clínico similar a la gripe y leve malestar febril. Sin embargo, en menos de un 1% la infección puede progresar a una enfermedad neuroinvasiva más grave (WNND) e incluso la muerte, dependiendo de la respuesta inmune del huésped y de la cepa viral. WNND abarca a su vez tres síndromes diferentes: encefalitis, meningitis y parálisis flácida aguda.

El diagnóstico de laboratorio se realiza generalmente mediante pruebas serológicas a partir de suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) para detectar anticuerpos IgM específicos de WNV y se confirma mediante pruebas de neutralización por reducción de placas (PRNTs). Sin embargo, la reactividad cruzada con las infecciones causadas por otros flavivirus sigue siendo el principal problema de los test de diagnóstico serológicos. A este respecto, diferentes protocolos basados en PCR se han desarrollado para detectar el RNA viral. Para realizar estas pruebas podemos partir de muestras de suero y LCR, recogidas durante el curso temprano de la enfermedad, así como muestras de tejidos adicionales como la orina, donde se puede detectar durante mucho más tiempo y en concentraciones más altas.

El virus de la fiebre amarilla es un virus de RNA perteneciente a la familia *Flaviviridae*. El término "amarillo" del nombre de este virus hace referencia a la ictericia que presentan algunos pacientes debido a la afección hepática. La fiebre amarilla es una enfermedad zoonótica hemorrágica viral aguda que se transmite entre humanos y monos a humanos a través de los mosquitos, principalmente por *Aedes (aegypti)* y *Haemogogus*

El período de incubación es generalmente de 3 a 6 días desde la infección hasta el desarrollo de la enfermedad. Muchas personas no experimentan síntomas, pero cuando estos ocurren, los más comunes son una fase febril aguda con mialgia, dolor de cabeza, dolor de espalda, anorexia, náuseas y a veces vómitos; síntomas que suelen resolverse dentro de una semana. Un porcentaje bajo de pacientes entran en una segunda fase más tóxica a las 24 horas de la remisión inicial y desarrollan síntomas severos (con fiebre alta, ictericia, sangrado y daño renal). La mitad de los pacientes que entran en esta fase tóxica mueren; debido a que actualmente no hay ningún tratamiento antiviral específico, pero el desenlace mejora con el tratamiento de la deshidratación, la insuficiencia hepática y renal y la fiebre. Por lo tanto, la vacunación y el control de mosquitos son los medios más importantes para prevenir la fiebre amarilla.

La fiebre amarilla es difícil de diagnosticar, especialmente durante las primeras etapas. Se puede confundir con malaria severa, leptospirosis, hepatitis viral (especialmente las formas fulminantes de la hepatitis B y D), otras fiebres hemorrágicas, infección con otros flavivirus (virus del Dengue, Zika y del Nilo Occidental) y envenenamiento.

Por lo general, la detección del virus de la fiebre amarilla se lleva a cabo mediante cultivo de virus en células susceptibles, seguida de inmunofluorescencia, ELISA, estudio inmunohistoquímico o PCR. Para cuantificar la carga de partículas infecciosas en cultivo celular o muestras de suero, el ensayo de placa sigue siendo el método comúnmente utilizado. Sin embargo, esta técnica es incómoda y requiere mucho tiempo. Con el



reciente desarrollo de la PCR a tiempo real, existe una alternativa rápida y precisa para cuantificar la carga viral en la sangre.

El virus Mayaro (MAYV) es un virus RNA monocatenario positivo, envuelto y perteneciente al género *Alphavirus*, de la familia *Togaviridae*. Se cree que los vectores involucrados en su ciclo de transmisión son los mosquitos, especialmente los del género *Haemagogus*, aunque los mosquitos de género *Aedes* spp. también pueden ser vectores competentes. Estos vectores transmiten el virus a primates y aves e incluso en ocasiones a seres humanos.

Los estudios filogenéticos llevados a cabo a partir de un fragmento del marco de lectura abierto de la poliproteína estructural sugieren la clasificación de MAYV en 2 genotipos diferentes: D (incluye aislados de todos los países) y L (contiene cepas detectadas sólo en Brasil).

La enfermedad causada por Mayaro dura de 3-5 días e incluye fiebre, dolor de cabeza, sarpullido, mialgia, artralgia y ocasionalmente artritis, la cual puede ser muy debilitante y puede persistir durante meses. Esta sintomatología es bastante similar a otros virus transmitidos por artrópodos, siendo a veces clínicamente indistinguibles del virus Dengue, la fiebre por virus Chikungunya, Malaria, la rabia, el sarampión u otras enfermedades arbovirales, por lo que se requiere utilizar una prueba sensible y específica para evitar un diagnóstico incorrecto.


Este kit de detección de PCR en tiempo real permite un diagnóstico fiable del virus Mayaro mediante la amplificación del gen nsp1, que ha demostrado ser la mejor diana para su detección debido a sus secuencias altamente conservadas. Debido a que el MAYV es transmitido por la sangre y transmitido por mosquitos, la sangre es la muestra humana habitual que se recolecta. El suero y el plasma se preparan a partir de esta muestra de sangre y se usan para determinar la infección de Mayaro.

3. Procedimiento

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de los virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, fiebre amarilla y/o Mayaro en muestras clínicas. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de los virus se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes específicos. (Tabla 1, Patógenos detectados en cada tubo de reacción y genes diana).

La tira de 8 pocillos de VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo las siguientes mezclas de reacción para la detección de las dianas específicas (Tabla 1):





	Código	Controles	Mezcla de reacción localizada dentro de cada pocillo Patógenos y genes diana
1	ZDC	EC	Zika, Dengue & Chikungunya
			Zika (gen <i>envelope</i>), Dengue (3' Non coding region) y Chikungunya (gen <i>NSP1</i>)
2	WNV	IC	West Nile Virus
			West Nile Virus (una secuencia conservada de la región genómica 5'UTR)
3	FEV	IC	Yellow Fever
			Yellow Fever (una secuencia conservada de la región genómica 5'UTR)
4	MYV	IC	Mayaro Virus
			Mayaro Virus (gen <i>nsp1</i>)

Tabla 1. *Tropical panel I* 8-well strips incluidas in VIASURE *Tropical panel I* Real Time PCR Detection Kit. Mezcla de reacción localizada dentro de cada pocillo, patógenos detectados y genes diana. CI: Control interno Tenga en cuenta que la primera mezcla de reacción se coloca en los extremos de la tira.

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Cada virus RNA es amplificado y detectado en los canales específicos (FAM, HEX, ROX, y/o Cy5) y el control interno (CI) en canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2) (Tabla 5).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 2 y 3:



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Tropical Panel I</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Tropical Panel I</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	6/12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-TP0112L y VS-TP0112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Tropical Panel I</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Tropical Panel I</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-TP0113L y VS-TP0113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. Cuando



se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506).

Para verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (si está disponible, Ref. VS-TP0113L y VS-TP0113H). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- **Tenga en cuenta que la primera mezcla de reacción se coloca en los extremos de la tira.**
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras y deben ser gestionadas 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.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.

8. Procedimiento del test

8.1. Extracción de RNA

Realizar la preparación de la muestra siguiendo el protocolo del sistema manual o de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de RNA a partir muestras de clínicas (sangre, suero, plasma, orina, tejidos y otros), puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin® RNA Virus (Macherey Nagel).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- NX-48 Viral NA Kit, utilizando Nextractor® NX-48 system (Genolution).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- ZP02003 MagPurix Viral Nucleic Acid Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)
- ZP02013 MagPurix Viral RNA Extraction kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Tropical Panel I* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Tropical Panel I* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su resuspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras. **Obsérvese que la primera mezcla de reacción se coloca en los**



extremos de la tira (Tabla 1) y cada tira incluye dos reacciones de *Tropical Panel I*, pocillos 1 a 4: mezclas de reacción de ZDC, WNV, FEV y MYV).

1) Reconstituir el número de strips que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA/DNA extraído de cada muestra, de *Tropical Panel I* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en los 8 pocillos de cada strip y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:


Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45°C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM, ROX, Cy5 y/o HEX (JOE o VIC). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2).



Las mezclas de reacción situadas en cada pocillo de la tira de *Tropical Panel I* permiten la detección específica de cada patógeno en los siguientes canales (Tabla 5).



	Código	Canales			
		FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ZDC	Dengue Virus	Control Interno	Chikungunya virus	Zika virus
2	WNV	West Nile virus	Control Interno	-	-
3	FEV	Yellow Fever	Control Interno	-	-
4	MYV	Mayaro Virus	Control Interno	-	-
4	MYV	Mayaro Virus	Control Interno	-	-
3	FEV	Yellow Fever	Control Interno	-	-
2	WNV	West Nile virus	Control Interno	-	-
1	ZDC	Dengue Virus	Control Interno	Chikungunya virus	Zika virus

Table 5. Patógenos identificados en cada canal de detección.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo en cada run valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el control negativo de cada pocillo de la tira de *Tropical Panel I* (4 pocillos) y la presencia de señal para el control positivo del *Tropical Panel I* de cada pocillo de la tira de *Tropical Panel I* (4 pocillos). Comprobar la emisión de la señal del control interno (mezclas de reacción ZDC, WNV, FEV y MYV) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. 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.

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

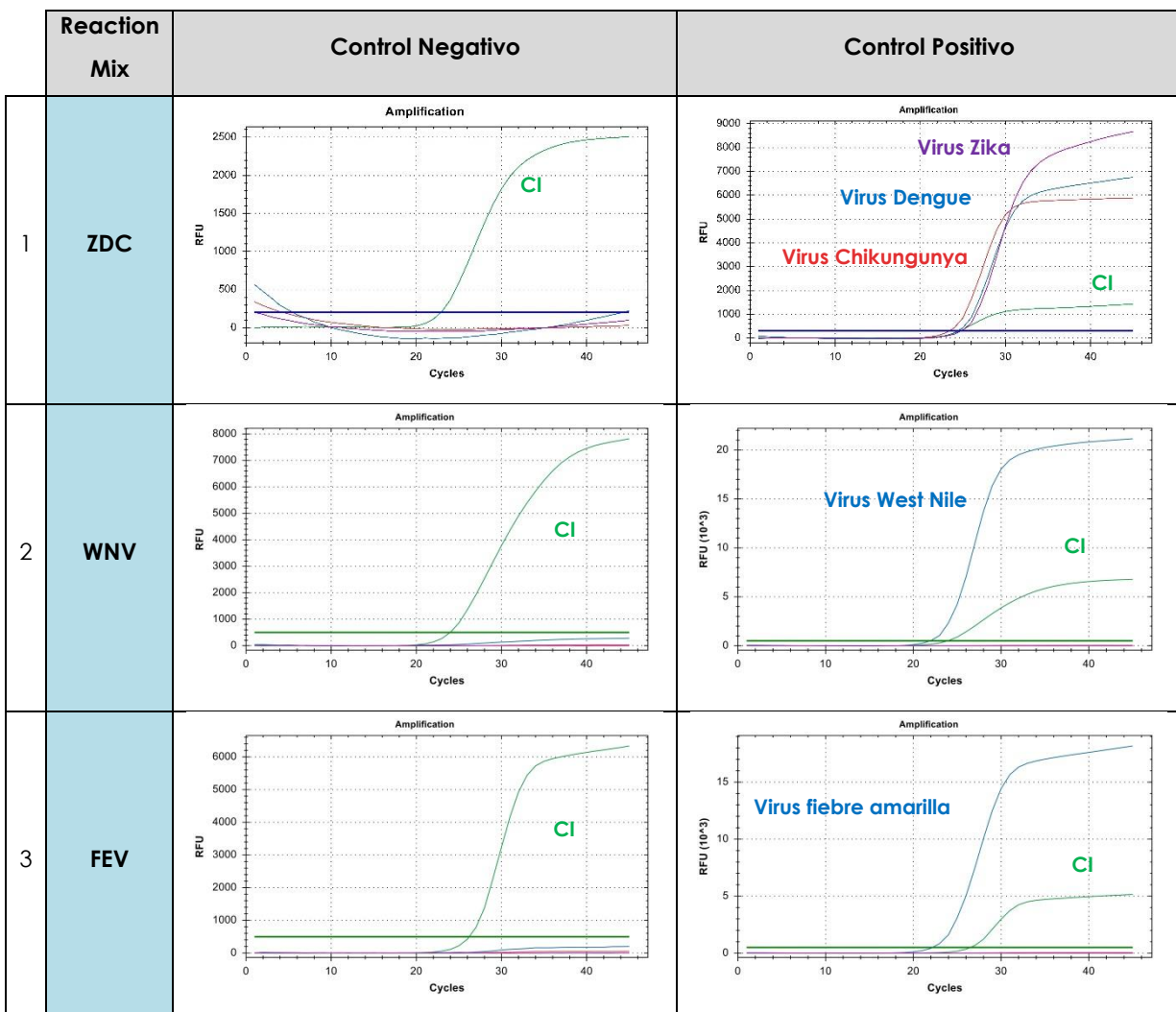
Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno (si lo presenta).

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



	Reaction Mix	Patógenos	Canales			
			FAM	HEX	ROX	Cy5
1	ZDC	Virus Dengue	Positivo			
		Virus Chikungunya			Positivo	
		Control interno		Positivo/Negativo		
		Virus Zika				Positivo
2	WNV	Virus West Nile	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
3	FEV	Virus fiebre amarilla	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		
4	MYV	Mayaro Virus	Positivo			
		Control interno		Positivo/Negativo		

Tabla 6. Interpretación de la muestra Positivo: curva de amplificación. Vacío: sin curva de amplificación.



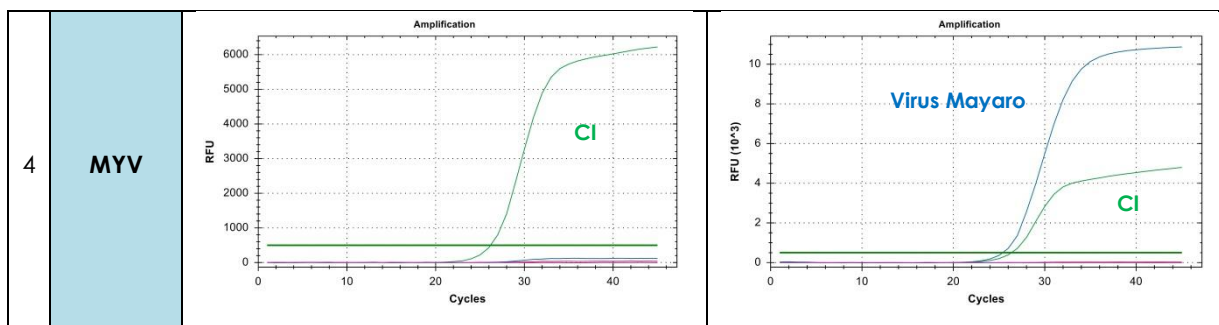


Tabla 7. Amplificación de control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras de suero y orina.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. 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 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 virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, fiebre amarilla y/o Mayaro, 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.

11. Control de calidad

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.



12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit (para **Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix**) se evaluó con muestras procedentes de los paneles INSTAND y QCMD. Las características clínicas del test VIASURE se testaron utilizando 102 muestras clínicas. Los resultados se compararon con los reports finales de los programas EQA:

	EQA Reports			
		+	-	Total
Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix	+	25	0	25
	-	1	76	77
	Total	26	76	102

Tabla 8. Resultados comparativos para Virus Zika

	EQA Reports			
		+	-	Total
Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix	+	27	0	27
	-	3	72	75
	Total	30	72	102

Tabla 9. Resultados comparativos para Virus Dengue

	EQA Reports			
		+	-	Total
Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix	+	29	1	30
	-	2	70	72
	Total	31	71	102

Tabla 10. Resultados comparativos para Virus Chikungunya

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit (para virus **West Nile**) se evaluó con los paneles de muestras de QCMD 2014, 2016, 2017 y 2018 de West Nile Virus RNA EQA Programme y con INSTAND e.V.'s Virus Genome Detection – West Nile Virus 2016 y 2017. Estos paneles se componen de un total de 64 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte. Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EEC para la detección de virus West Nile en los años 2016 y 2017. Todas las muestras positivas para virus West Nile (47/64) pudieron ser detectadas. Las muestras contenían diluciones de las cepas del virus West Nile NY99 (linaje 1), Ug37 y Heja (linaje 2). En cambio, tanto la muestra West Nile negativa como la West Nile negativa pero positiva para otros flavivirus (Virus de la Encefalitis Japonesa, Virus Dengue serotipos 1-4, Encefalitis transmitida por garrapatas, Virus de la Fiebre Amarilla, virus Zika) pudieron ser confirmadas como negativas.

The clinical performance of VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit (para virus **fiebre amarilla**) se evaluó mediante paneles de QCMD de virus tropicales (Chikungunya, Dengue, Zika y West Nile Virus) de diferentes años (2014, 2015, 2016 y 2017). Estos paneles de QCMD contenían 9 muestras positivas para la fiebre amarilla. Los resultados se compararon con los informes finales de los programas. Otros virus tropicales como Dengue Virus Type 1, Dengue Virus Type 2, Dengue Virus Type 3, Dengue Virus Type 4, Zika Virus, Chikungunya



Virus, Japanese Encephalitis virus, West Nile Virus (cepas NY99 y Heja), y Tick borne Encephalitis virus, no fueron detectados.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile y fiebre amarilla utilizando VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción para los virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, fiebre amarilla y/o Mayaro.

12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de los virus Zika, Dengue, Chikungunya, West Nile, fiebre amarilla y Mayaro fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los arbovirus más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados, excepto los organismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Zika cepa MR 766 (Uganda)	-/+	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-/+
Virus Zika cepa 11474/16 (French Polynesia)	-/+	Virus St Louis Encephalitis cepa 17D	-
Virus Zika Estándar Internacional (French Polynesian, 11468/16)	-/+	Virus West Nile cepa H160/99	-/+
Virus Zika (African)	-/+	Virus West Nile Heja	-/+
Virus Zika cepa PF13/251013-18 (Asian)	-/+	Virus West Nile Ug37	-/+
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-/+	Virus fiebre amarilla cepa 17D	-/+
Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-/+	Virus Japanese Encephalitis	-
Virus Dengue 3 cepa H87	-/+	Plasmodium falciparum	-
Virus Dengue 4 cepa H241	-/+	Trypanosoma cruzi	-

Tabla 11. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Tropical Panel I* Real Time PCR Detection Kit para **Zika, Dengue & Chikungunya Reaction mix**, se evaluó frente a virus Zika (virus 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), Virus Dengue (virus Dengue 1 cepa Hawaii, virus Dengue 2 cepa New Guinea C, virus Dengue 3 cepa H87 y virus Dengue 4 cepa H241) y Virus Chikungunya (Virus Chikungunya S27 Petersfield (genotipo africano) y Virus Chikungunya cepa Martinique (genotipo asiático)), mostrando resultados positivos.

La reactividad de VIASURE **West Nile Virus Reaction mix** se evaluó frente a virus West Nile H160/99, Heja, Ug37 y NY99, mostrando resultados positivos.



La reactividad de VIASURE **Yellow Fever Virus Reaction mix** se evaluó frente a virus fiebre amarilla cepa 17D, mostrando resultados positivos.











13. Bibliography/Bibliografía

1. R.S. Lanciotti *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14(8): 1232-1239.
2. O. Faye *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology Journal* 2013; 10: 311.
3. A.C. Gourinat *et al.* Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases* 2015; 21(1): 84-86.
4. D. Musso *et al.* Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology* 2015; 68: 53-55.
5. D. Mussi *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases* 2015 21(2): 359-361.
6. J. Mlakar. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine* 2016.
7. C. Drosten *et al.* Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(7): 2323-2330.
8. A. Dumoulin *et al.* Pan-dengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(9): 3104-3106.
9. J. Liu *et al.* Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54(1): 49-58.
10. S.K. Mardekian and A.L. Roberts. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International* 2015: 834371.
11. K.A. Tsetsarkin *et al.* Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Current Opinion in Virology* 2016; 16: 143-150.
12. R.S. Lanciotti *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases journal* 2007; 13(5): 764-767.
13. Centers for Disease Control and Prevention. (<http://www.cdc.gov/>).
14. World Health Organization. (<http://www.who.int/>).
15. C. Chancey *et al.* The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International* 2015; 2015:376230.
16. A. Rizzoli *et al.* The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance* 2015; 20(20): 21135.
17. S. Linke *et al.* Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 2007; 146(1-2): 355-358.
18. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus (<https://www.cdc.gov/westnile/>).
19. World Health Organization. Zika virus and potential complications (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>).
20. J. Liu *et al.* Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54(1): 49-58.
21. A.G. Fernandes-Monteiro *et al.* New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2015; 11(7): 1865-1871.
22. World Health Organization. Yellow fever. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>



23. World Health Organization. Emergencies preparedness, response. Yellow fever. <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/en>
24. Centers for Disease Control and Prevention. Yellow fever. <https://www.cdc.gov/yellowfever/>.
25. M.T. Oliveira Mota *et al.* Complete Genome Sequence of Mayaro Virus Imported from the Amazon Basin to Sao Paulo State, Brazil. *Genome Announcements* 2015; 3(6): e01341-15.
26. J. Lednicky *et al.* Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. *Emerging infectious diseases* 2016; 22(11): 2000-2002.
27. M. Llagone-Barets *et al.* A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. *Journal of Clinical Virology* 2016; 77: 66-68.
28. M. L. Garcia de Figueiredo *et al.* Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2014; 47(6): 677-683.
29. B. Friedrich-Jänicke *et al.* Genome analysis of Mayaro virus imported to Germany from French Guiana. *Emerging infectious diseases* 2014; 20(7): 1255-1257.

14. Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

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



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL	
Fabricante	Modelo
Agilent Technologies	AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System ⁽¹⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System ⁽⁴⁾
Roche	Cobas z480 Analyzer ⁽⁴⁾

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test, sección 8.3) y transvasar a los tubos específicos diseñados para emplearse con los instrumentos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia.
	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	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". 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	
Mic Real Time PCR Cycler bms	FAM	Green	En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.

- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 – 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



- 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™, Mx3005™ and AriaMx 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.

Revision: November 2019





CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)
www.certest.es



VIASURE online

F-362 rev01

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC