

VIASURE

Viral Positive Control

Reagents RUO



VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO

RUO

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Este producto no tiene un propósito clínico declarado y no es para uso en diagnóstico clínico. No existe la pretensión o representación de proporcionar información para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad.

These instructions apply to the following reference / *Estas instrucciones aplican para las siguientes referencias:*

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO	VS-VP1ZIKRUO
VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO	VS-VP101ZIKRUO

Table A 1. Reference / *Referencias*.

Content

1.	Use	4
2.	Summary and Explanation	4
3.	Principle of the RUO kit	4
4.	Reagents provided	5
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	5
6.	Transport and storage conditions.....	5
7.	Additional information	6
8.	Test procedure	7
8.1	Reconstitution of the Positive Control	7
8.2	Nucleic Acid Extraction	7
8.3	Real-Time PCR	8
9.	Result interpretation	8
10.	Limitations of the test	9
11.	Quality control	9

Contenido

1.	Uso	10
2.	Introducción y explicación	10
3.	Procedimiento del kit RUO	10
4.	Reactivos suministrados.....	11
5.	Material requerido y no suministrado	11
6.	Condiciones de transporte y almacenamiento.....	11
7.	Información adicional	12
8.	Procedimiento del test	13
8.1	Reconstitución del control positivo	13
8.2	Extracción de Ácidos Nucleicos.....	13
8.3	PCR en tiempo real.....	14
9.	Interpretación de resultados.....	14
10.	Limitaciones del test	15
11.	Control de calidad	16
	Bibliography / Bibliografía	16
	Symbols for components and reagents.....	16
	Trademarks.....	16

ENGLISH

1. Use

For Research Use Only (RUO). Not for use in diagnostic procedures.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO is intended for monitoring the whole reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) process, from nucleic acid extraction to reverse transcription and amplification steps. This RUO kit must be used for research purposes and has no medical objective.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO contains non-replicative and non-infectious Zika virus particles that are expected to be processed along with research samples from individuals with clinical suspicion of Zika virus infection.

2. Summary and Explanation

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-transmitted virus in the family *Flaviridae* and genus *Flavivirus*¹. ZIKV is a single-stranded RNA virus with a positive-polarity RNA genome of approximately 11 kb. The encoded polyprotein is translated and co- and posttranslationally processed by viral and cellular proteases into three structural (capsid [C], premembrane [prM] or membrane [M], and envelope [E]) and seven nonstructural (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, and NS5) proteins².

3. Principle of the RUO kit

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO contains non-replicative and non-infectious recombinant viral particles in a lyophilized format, which have been created using the lentiviral system³. This system is based on the ability of lentivirus to package foreign RNA inside cells. The cells are co-transfected with two different lentiviral vectors: the packaging vector, which encodes for lentiviral structural proteins, lentiviral enzymes and lentiviral gene regulatory proteins, and the transfer vector, which contains the viral genome sequence that is completely customizable. This viral genome is bounded to lentiviral enzymes and enclosed by a lentiviral capsid that is surrounded by a matrix. This, in turn, is surrounded by a lipid bilayer (envelope) taken from the membrane of a cell when a newly formed viral particle buds from the cell. This viral particle is non-infectious as it lacks the envelope glycoprotein that allows the virus to enter the cell and, in addition, it is heat-treated⁴. This viral particle is also non-replicative as it is a defective virus without the ability to produce new viral particles.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO contains viral particles of Zika virus, which contain the whole genome of this virus.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO is designed for monitoring the performance of all RT-qPCR assays whose target regions belong to Zika virus genome. The RNA sequences are homologous to the Zika virus isolate ZIKV/H, sapiens/Brazil/Natal/2015 (GenBank: NC_035889.1).

4. Reagents provided

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO includes the following materials and reagents detailed in Table 1:

Reagent	Description	Colour	Amount
Viral Zika Total Positive Control	Non-infectious lyophilized viral particle	Red	4/1 vials
Viral Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the lyophilized product	Transparent vial with green cap	1 vial x 1 mL
Viral Negative Control	Non template control	Transparent vial with violet cap	4/1 vials x 1 mL

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials and equipment that are required but not included in the VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

- Real-Time PCR instrument (thermocycler).
- Nucleic acid extraction kit.
- Real-Time PCR assay.
- Ribonuclease (RNase)/ Deoxyribonuclease (DNase) free tubes.
- Vortex.
- Micropipettes.
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

6. Transport and storage conditions

- The RUO kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- The **Viral Rehydration Buffer** is intended for **four uses**. It is recommended to separate it into four aliquots (see section 8 "Test procedure") and store it at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Each vial of **Viral Zika Total Positive Control** is intended for **one use**. Once this Positive Control has been reconstituted (see section 8 "Test procedure"), it must be subjected to nucleic acid extraction and RT-qPCR. If the reconstituted vial cannot be processed immediately after rehydration, store at 4°C or 25°C for up to 24 hours or freeze at -20°C or -80°C for a longer period (do not refreeze).
- Each vial of **Viral Negative Control** is intended for **one use**. Store at 2-40°C until use.
- It is recommended to separate the RNA extracted from the Viral Zika Total Positive Control into aliquots to minimize freeze-thaw cycles. The RNA has been validated to remain stable after 10 freeze-thaw cycles at either -20°C or -80°C.

7. Additional information

- VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO is for Research Use Only. It is not for use in diagnostic or therapeutic procedures. The performance characteristics of this product have not been established.
- 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.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Design a unidirectional workflow. It should begin with the aliquots of the Viral Rehydration Buffer in a clean area, and then move to the extraction area, where the Viral Zika Total Positive Control is rehydrated and extracted along with the Viral Negative Control and the research samples. Finally, move on to the nucleic acid amplification and detection area. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Always avoid microbial and RNase/DNase contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- The Viral Zika Total Positive Control and the Viral Negative Control should be treated as research specimens and they should undergo the same process. Samples must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, 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, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- The viral particles that constitute the Viral Zika Total Positive Control are non-replicative since they are not capable of producing new viral particles. In addition, they are non-infectious, as they lack the envelope glycoprotein, and they are heat-treated. The viral particles confer resistance to puromycin, so uninfected cells are naturally sensitive to this antibiotic, while infected cells are resistant. The non-infectivity of the virus has been proven by the absence of colonies resistant to puromycin after infection with the Viral Zika Total Positive Control.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO do not require Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each nucleic acid extraction kit, automated extraction system, RT-qPCR kit or real-time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.

8. Test procedure

8.1 Reconstitution of the Positive Control

The Viral Rehydration Buffer is intended for four uses, so it is recommended to separate it into **four aliquots (240 µl/each** in RNase/DNase-free tubes) to avoid contamination between uses. This step should be performed in a clean area separate from the Extraction Area and before handling the Viral Zika Total Positive Control. The aliquots can be stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.

Reconstitute the lyophilized Viral Zika Total Positive Control (red vial) by adding **220 µl** of the supplied **Viral Rehydration Buffer** (transparent vial with green cap previously aliquoted) and vortex thoroughly. It is recommended to perform this step in the Extraction Area and immediately processing it along with the Viral Negative Control (transparent vial with violet cap) and the research specimens. If the reconstituted vial cannot be processed immediately after rehydration, see section 6 "Transport and storage conditions".

In case the Viral Rehydration Buffer (supplied in the kit) is replaced by another rehydration buffer, this must be validated by the final user.

8.2 Nucleic Acid Extraction

The Viral Zika Total Positive Control and the Viral Negative Control must be subjected to the same nucleic acid extraction process than research samples. Any manual or automatic optimized system from human clinical specimens can be used for nucleic acid extraction, following the manufacturer's instructions or the in-house protocol.

The following commercially available nucleic acid extraction kits included in table 2 have been used with VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

Nucleic acid extraction kit	Equipment
MagDEA® Dx SV (Precision System Science Co.)	MagLEAD® 12gC Instrument
QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)	N/A
Invisorb® Spin Universal Kit (Invitek)	N/A
Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)	Maxwell® RSC Instrument
MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)	KingFisher Flex System
MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience)	MagCore®HF16 automated Nucleic Acid Extractor System
DNA/RNA Extraction Kit (Nanjing Vazyme Medical Technology Co.)	Vazyme VNP-32YL

Table 2. Nucleic acid extraction kits compatible with VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

8.3 Real-Time PCR

The RNA obtained in the nucleic acid extraction process can be amplified using any in-house or commercially available RT-qPCR kit whose targets belong to Zika virus genome. Manufacturer's instructions for the Real-Time PCR kits or the in-house protocol must be followed.

These controls must not be substituted for the positive and negative controls provided with the RT-qPCR kits.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO has also been used with the following commercial RT-qPCR kits, following the manufacturer's instructions.

- VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit.
- VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO must follow the same procedure as research samples. If the nucleic acid extraction or RT-qPCR conditions differ from those used here, the procedure must be validated by the final user.

9. Result interpretation

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

The Viral Zika Total Positive Control and the Viral Negative Control must be included in each run of nucleic acid extraction and RT-qPCR. The Viral Zika Total Positive Control is used to monitor the performance of the whole process, whereas the Viral Negative Control is used to monitor the cross-contamination that may occur during the whole process. Both controls are required to validate the reaction and accurately interpret the results of the tested samples.

A valid Viral Zika Total Positive Control result is considered when an amplification curve is observed in the RT-qPCR assay. The C_q value obtained is dependent on the performance of the nucleic acid extraction method and the sensitivity of the RT-qPCR assay used.

A valid Viral Negative result is considered when no amplification curve is observed in the RT-qPCR assay or when an amplification curve is observed at a C_q value greater than the cut-off C_q indicated in the manufacturer's instructions of the RT-qPCR assay used.

If one or more controls are not valid, the sample results cannot be interpreted.

All samples that have been processed along with a Viral Zika Total Positive Control or/and Viral Negative Control with a not valid result, must be retested from the nucleic acid extraction.

10. Limitations of the test

- The test is to be used for research use only. Not for use in diagnostic procedures.
- An appearance of the Viral Zika Total Positive Control in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- This RUO test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- The Viral Zika Total Positive Control and the Viral Negative Control must not be substituted for the positive and negative controls provided with the RT-qPCR kits.
- Viral Zika Total Positive Control may contain traces of plasmid DNA.
- Changes in the nucleotide sequences of primer or probes to detect new or unknown Zika virus variants can lead to a failure in the identification of the Viral Zika Total Positive Control.
- Since the entire genome of Zika virus has been included in the design, it can rarely happen that primer or probes used do not hybridize.
- Performance of VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO depends on the efficiency of the nucleic acid extraction method and the RT-qPCR assay used by each laboratory. Each test procedure must be validated by the final user.
- Reconstitution of the Viral Zika Total Positive Control with a reagent different from the Viral Rehydration Buffer (supplied with the kit) must be validated by the final user.
- Test failure results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper transport, storage, and/or handling of the kit.
 - Improper processing procedures (reconstitution of the positive control, nucleic acid extraction, RT-qPCR assay).
 - Degradation of the viral RNA during storage and/or processing.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO should not be used as calibrator. The concentration of Viral Zika Total Positive Control is obtained by digital PCR following a specific workflow. Deviations from this workflow can lead to concentration variations.

11. Quality control

The expected values of VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO depends on the procedure (nucleic acid extraction method and RT-qPCR assay), so each test procedure must be validated by the final user.

The concentration of Viral Zika Total Positive Control is stated in the Certificate of analysis of each batch, available upon request.

SPANISH

1. Uso

Solo para uso en investigación (Research Use Only, RUO). No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO permite monitorizar todas las etapas de PCR en tiempo real con transcripción inversa (RT-qPCR), desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la retrotranscripción y los pasos posteriores de amplificación. Este kit RUO debe utilizarse con fines de investigación y no tiene ningún objetivo médico.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO contiene partículas virales del virus de Zika no replicativas y no infecciosas que están pensadas para ser procesadas junto con muestras de investigación procedentes de individuos con sospecha de infección por virus de Zika.

2. Introducción y explicación

El virus del Zika (ZIKV) es un virus transmitido por mosquitos de la familia *Flaviridae* y del género *Flavivirus*¹. ZIKV es un virus de ARN monocatenario con un genoma de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 11 kb. La poliproteína codificada es traducida y procesada co y postraduccionamente por proteasas virales y celulares en tres proteínas estructurales (cápside [C], premembrana [prM] o membrana [M] y envoltura [E]) y siete no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5)².

3. Procedimiento del kit RUO

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO contiene partículas virales recombinantes no replicativas y no infecciosas en formato liofilizado, creadas utilizando el sistema lentiviral³. Este sistema se basa en la capacidad de los lentivirus para empaquetar RNA exógeno en el interior de las células. Las células son co-transfectadas con dos vectores lentivirales diferentes: el vector de empaquetamiento (codifica proteínas estructurales, enzimas y proteínas reguladoras de la expresión génica de los lentivirus) y el vector de transferencia (contiene la secuencia genómica del virus). Este genoma viral se encuentra unido a enzimas lentivirales en el interior de una cápside, la cual está rodeada por una matriz. Esta, a su vez, está rodeada por una bicapa lipídica (denominada envuelta) adquirida de la membrana celular cuando la partícula recién formada sale de la célula. La partícula viral formada es no infecciosa, ya que carece de la glicoproteína de envuelta que permite que el virus se introduzca en la célula y, además, ha sido sometida a un tratamiento a elevada temperatura⁴. Por otra parte, es no replicativa, ya que es un virus defectuoso sin capacidad para producir nuevas partículas virales.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO contiene partículas virales del virus de Zika, que contienen el genoma completo de este virus.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO es compatible con aquellos ensayos de RT-qPCR cuyas regiones diana estén contenidas en el genoma del virus de Zika. La secuencia de RNA es homóloga al virus Zika aislado ZIKV/H, sapiens/Brazil/Natal/2015 (GenBank: NC_035889.1).

4. Reactivos suministrados

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO incluye los materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
Viral Zika Total Positive Control	Partícula viral no infecciosa liofilizada	Rojo	4/1 viales
Viral Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto liofilizado	Vial transparente con tapa verde	1 vial x 1 mL
Viral Negative Control	Control negativo	Vial transparente con tapa violeta	4/1 viales x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales requeridos, pero no incluidos en VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO:

- Equipo de PCR en tiempo real (termociclador)
- Kit de extracción de ácidos nucleicos.
- Ensayo de PCR en tiempo real.
- Tubos libres de ribonucleasas (RNasas) y desoxirribonucleasas (DNasas).
- Vórtex.
- Micropipetas.
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits RUO puede realizarse a 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- **Viral Rehydration Buffer** está destinado a **cuatro usos**, por lo que es recomendable realizar cuatro alícuotas (ver apartado 8 "Procedimiento del test") y almacenarlas a 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Cada vial de **Viral Zika Total Positive Control** es de **un único uso**. Una vez reconstituido el Control Positivo (ver apartado 8 "Procedimiento del test") debe ser sometido a extracción de ácidos nucleicos y RT-qPCR. Si el vial reconstituido no puede ser procesado inmediatamente después de la rehidratación, se recomienda almacenarlo a 4°C o 25°C si va a ser utilizado en las próximas 24 horas o congelarlo a -20°C o -80°C para períodos más largos (no volver a congelar).
- Cada vial de **Viral Negative Control** es de **un único uso**. Almacenar a 2-40°C hasta su utilización.
- Se recomienda alícuotar el RNA extraído de Viral Zika Total Positive Control para minimizar los ciclos de congelación-descongelación. Se ha validado la estabilidad del RNA tras 10 ciclos de congelación-descongelación tanto a -20°C como a -80°C.

7. Información adicional

- VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO es para uso exclusivo en investigación. No es para uso en procedimientos diagnósticos o terapéuticos. No se han establecido las características de rendimiento de este producto.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- No utilizar los reactivos si los sobres que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los reactivos 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 una vez abiertos.
- 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.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar con las alícuotas de Viral Rehydration Buffer en una zona limpia, y después pasar al área de extracción, donde se rehidrata y extrae Viral Zika Total Positive Control junto con Viral Negative Control y las muestras de investigación. Por último, pasar al área de amplificación y de detección de ácidos nucleicos. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior.
- Evitar en todo momento la contaminación microbiológica o de RNasa/DNasa de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipetas estériles, desechables, libres de RNasa/DNasa, y de barrera para aerosoles o de desplazamiento positivo.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Usar ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicarse productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Viral Zika Total Positive Control y Viral Negative Control deben ser tratados como las muestras de investigación y deben seguir el mismo proceso. Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación nacional sobre residuos sanitarios. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las partículas virales que constituyen Viral Zika Total Positive Control son no replicativas, porque no son capaces de producir nuevas partículas virales, y no infecciosas porque carecen de la glicoproteína de envuelta y, además, han sido sometidas a un tratamiento a elevada temperatura. Las partículas virales confieren resistencia a puromicina, por lo que las células no infectadas son naturalmente sensibles a este antibiótico, mientras que las células infectadas son resistentes. La no infectividad del virus ha sido demostrada por la ausencia de colonias resistentes a puromicina después de la infección con Viral Zika Total Positive Control.
- Las muestras y reactivos deben manipularse en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipos de protección personal (EPP) de acuerdo con las directrices actuales para el manejo de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los desechos de acuerdo con las regulaciones locales, estatales y federales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.

- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO no requiere ficha de datos de seguridad debido a que se clasifica como no peligroso para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP) o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de referencia de cada kit de extracción de ácidos nucleicos, sistema de extracción automatizado, kit RT-qPCR o equipo de PCR en tiempo real para advertencias, precauciones y procedimientos adicionales.

8. Procedimiento del test

8.1 Reconstitución del control positivo

Viral Rehydration Buffer está destinado a cuatro usos, por lo que es recomendable realizar **cuatro alícuotas (240 µl/alícuota** en tubos libres de RNasa/DNasa) para evitar la contaminación entre usos. Este paso debe realizarse en una zona limpia separada del área de extracción y antes de manipular Viral Zika Total Positive Control. Las alícuotas pueden almacenarse a 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Reconstituir Viral Zika Total Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo **220 µl** de **Viral Rehydration Buffer** (vial transparente con tapa verde previamente alícuotado) y mezclar con ayuda de un vórtex. Se recomienda llevar a cabo este paso en el área de extracción y procesarlo inmediatamente junto con Viral Negative Control (vial transparente con tapa violeta) y las muestras de investigación. Si el vial reconstituido no puede ser procesado inmediatamente después de la rehidratación, ver apartado 6 "Condiciones de transporte y almacenamiento".

En el caso de que Viral Rehydration Buffer (suministrado en el kit) sea sustituido por otro tampón de rehidratación, este debe ser validado por el usuario final.

8.2 Extracción de Ácidos Nucleicos

Viral Zika Total Positive Control y Viral Negative Control deben someterse al mismo proceso de extracción de ácidos nucleicos que las muestras de investigación. Cualquier sistema manual o automático optimizado para la extracción de ácidos nucleicos en muestras clínicas humanas puede ser utilizado, siguiendo las instrucciones del fabricante o el protocolo interno.

Los kits de extracción de ácidos nucleicos disponibles comercialmente, incluidos en la tabla 2, han sido utilizados con VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

Kits de extracción de ácidos nucleicos	Equipos
MagDEA® Dx SV (Precision System Science Co.)	MagLEAD® 12gC Instrument
QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen)	N/A
Invisorb® Spin Universal Kit (Invitex)	N/A
Maxwell® RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)	Maxwell® RSC Instrument
MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific)	KingFisher Flex System
MagCore® Viral Nucleic Acid Extraction Kit (RBC Bioscience)	MagCore®HF16 automated Nucleic Acid Extractor System
DNA/RNA Extraction Kit (Nanjing Vazyme Medical Technology Co.)	Vazyme VNP-32YL

Tabla 2. Kits de extracción de ácidos nucleicos compatibles con VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO.

8.3 PCR en tiempo real

El RNA obtenido en el proceso de extracción de ácidos nucleicos puede ser amplificado utilizando cualquier protocolo de RT-qPCR cuyas dianas estén incluidas en el genoma del virus de Zika. Se deben seguir las instrucciones del fabricante del test RT-qPCR o el protocolo interno.

Estos controles no deben sustituir a los controles positivo y negativos proporcionados con los kits RT-qPCR.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO también ha sido utilizado con los siguientes kits RT-qPCR comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- VIASURE Zika Virus Real Time PCR Detection Kit.
- VIASURE Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit.

VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO debe seguir el mismo procedimiento de diagnóstico que las muestras de investigación. Si la extracción de los ácidos nucleicos o la reacción de RT-qPCR se realizan en condiciones diferentes de las descritas anteriormente, el procedimiento debe ser validado por el usuario final.

9. Interpretación de resultados

Solo para uso en investigación (Research Use Only, RUO). No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.

Viral Zika Total Positive Control y Viral Negative Control deben ser incluidos en cada extracción de ácidos nucleicos y en cada reacción de RT-qPCR. Viral Zika Total Positive Control se utiliza para monitorizar el rendimiento del proceso, mientras que Viral Negative Control se utiliza para detectar posibles problemas de contaminación cruzada que puedan tener lugar durante la extracción de RNA y/o durante la preparación de la reacción RT-qPCR. Se requieren ambos controles para validar la reacción e interpretar correctamente los resultados de las muestras analizadas.

Se considera un resultado válido de Viral Zika Total Positive Control cuando se observa una curva de amplificación en el ensayo de RT-qPCR. El valor de Cq obtenido es dependiente del rendimiento del método de extracción de ácidos nucleicos y de la sensibilidad del ensayo de RT-qPCR utilizado.

Se considera un resultado válido de Viral Negative Control cuando no se observa curva de amplificación en el ensayo de RT-qPCR o cuando se observa curva de amplificación en un valor de Cq superior al Cq de corte indicado en las instrucciones del fabricante del ensayo de RT-qPCR utilizado.

Si uno o más controles no son válidos, los resultados de la muestra no pueden ser interpretados.

Todas las muestras que han sido procesadas junto con Viral Zika Total Positive Control y/o Viral Negative Control cuyo resultado haya sido fallido, deben volver a procesarse realizando una nueva extracción de ácidos nucleicos.

10. Limitaciones del test

- Solo para uso en investigación (Research Use Only, RUO). No debe utilizarse en procedimientos de diagnóstico.
- Un aspecto de Viral Zika Total Positive Control en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad del Control Positivo.
- Este kit RUO es una prueba cualitativa y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Viral Zika Total Positive Control y Viral Negative Control no deben sustituir a los controles positivos y negativos proporcionados por los kits RT-qPCR.
- Viral Zika Total Positive Control puede contener trazas de DNA plasmídico.
- Cambios en la secuencia de los cebadores o sondas para detectar nuevas variantes del virus de Zika pueden conducir a un fallo en la identificación de Viral Zika Total Positive Control.
- Dado que se ha incluido el genoma completo del virus de Zika en el diseño, rara vez puede suceder que los cebadores o sondas utilizadas no hibriden.
- El rendimiento de VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO depende de la eficiencia del método de extracción de ácidos nucleicos y del ensayo de RT-qPCR utilizado por cada laboratorio. Cada procedimiento debe ser validado por el usuario final.
- La reconstitución de Viral Zika Total Positive Control con un reactivo diferente al tampón de rehidratación suministrado en VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO debe ser validado por el usuario final.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a resultados de test fallido, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de transporte, almacenamiento y/o manipulación del kit.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (reconstitución del control positivo, extracción de ácidos nucleicos, RT-qPCR).
 - Degradación del RNA viral durante el almacenamiento y/o procesamiento.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO no debe ser utilizado como calibrador. La concentración de Viral Zika Total Positive Control se ha obtenido por PCR digital siguiendo un procedimiento específico. Variaciones en este procedimiento pueden conducir a valores de concentración diferentes.

11. Control de calidad

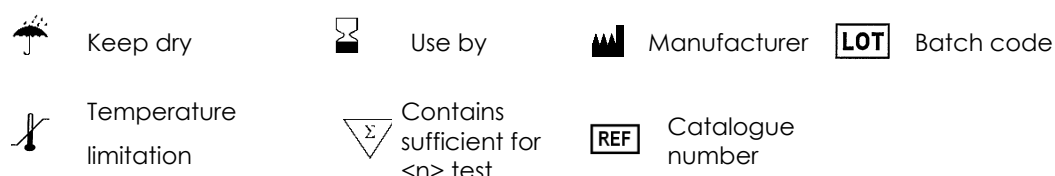
Los valores esperados de VIASURE Viral Zika Total Positive Control Reagents RUO dependen del procedimiento de utilizado (método de extracción de ácidos nucleicos y ensayo RT-qPCR), por lo que cada procedimiento debe ser validado por el usuario final.

La concentración de cada lote de Viral Zika Total Positive Control se indica en el Certificado de Análisis, disponible bajo petición.

Bibliography / Bibliografía

1. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232. doi:10.3201/EID1408.080287
2. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology*. 2013;10. doi:10.1186/1743-422X-10-311
3. T S, MA B, Y I. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.* 2012;443(3):603-618. doi:10.1042/BJ20120146
4. F K, L S, S C, L K, HM B. Efficient inactivation of pseudotyped HIV-based lentiviral vectors and infectious HIV. *J Virol Methods.* 2020;276. doi:10.1016/J.JVIROMET.2019.113768

Symbols for components and reagents



Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Change Control / Control de cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original version / Versión original	12/09/22

Table A 2. Control change table / Tabla de control de cambios.

Revision: 12th September 2022

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

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

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead

F-566 rev02