

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

West Nile Virus

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

VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-WNV106LE
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-WNV106HE
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-WNV112LE
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-WNV112HE
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-WNV113LE
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-WNV113HE
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-WNV136E
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-WNV172E



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification of West Nile virus in clinical samples from patients with signs and symptoms of West Nile virus infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the West Nile virus 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 West Nile virus.

2. Summary and Explanation

Since its initial isolation in Uganda in 1937 through the present, West Nile virus (WNV) has propagated to a vast region of the globe and is now 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.

WNV has a single stranded positive-polarity RNA genome which encodes a single polyprotein that is co- and posttranslationally cleaved into 3 structural proteins and 7 nonstructural proteins. 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.

3. Principle of the procedure

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the West Nile virus 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 sequence of genomic region 5'UTR using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

VIASURE *West Nile Virus* 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 RNA target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *West Nile Virus* 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. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity. West Nile virus RNA targets are amplified and detected in FAM channel and the Extraction control (EC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1, 2 and 3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices (See Annex 1). Table 3 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>West Nile Virus</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>West Nile Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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 1. Reagents and materials provided in VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-WNV106LE, VS-WNV106HE, VS-WNV112LE and VS-WNV112HE.



Reagent/Material	Description	Color	Amount
West Nile Virus 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
West Nile Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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 2. Reagents and materials provided in VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-WNV113LE and VS-WNV113HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
West Nile Virus 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	9/18 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
West Nile Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	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
4-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	9/18 X 4-cap strip

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-WNV136E and VS-WNV172E. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

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 West Nile Virus 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).
- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments).



VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ 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-WNV113LE, VS-WNV113HE, VS-WNV136E and VS-WNV172E). 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.
- For references VS-WNV136E and VS-WNV172E (compatible with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- 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.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

8.1. Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstitute the lyophilized *West Nile Virus* Positive Control in an area away from the other components.

8.2. RNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

If the Extraction Control is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5 µL of the EC to the specimen and/or lysis buffer mixture. (clinical specimen, as well as, positive control and/or negative control). Close each tube and vortex for 10 seconds.

If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1 µL of the EC should be added to the reconstituted Reaction-Mix.

For RNA extraction from clinical samples (serum, CSF, urine, 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.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, using QIAcube instrument (Qiagen).



8.3. Lyophilized positive control

West Nile Virus 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 West Nile Virus Positive Control (red vial) by adding 100 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.

8.4. PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from plates or strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

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

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of RNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted West Nile Virus Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

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 (West Nile Virus) and HEX, JOE or VIC channels (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

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 control well and the presence of signal for West Nile Virus in the positive control well. Check Extraction Control (EC) signal to verify the extraction procedure and 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. Using the following table read and analyze the results:

West Nile Virus (FAM)	Extraction control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	West Nile Virus Positive
-	+	-	+	West Nile Virus Negative
-	-	-	+	Experiment fail
+	+	+	-	Experiment fail

Table 5. Sample interpretation

+: Amplification curve

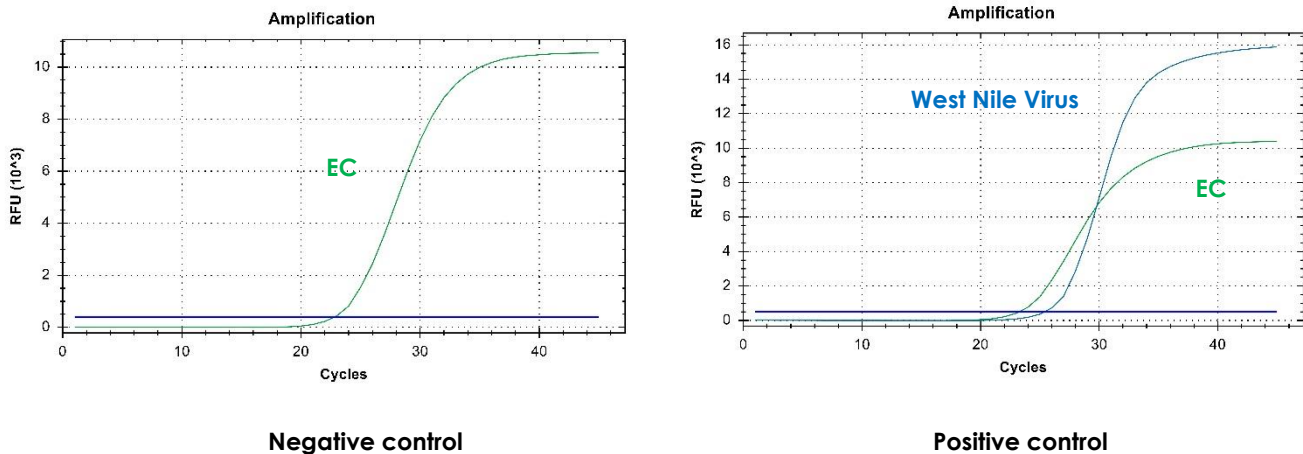
-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the Extraction Control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of Extraction Control 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 Extraction Control is positive. A failure in the extraction procedure and/or an inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of Extraction Control.



Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



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

In case of absence of signal in both, extraction control and target 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 nucleic acids purification and/or 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.

Differences can be observed in the values of Ct in the extraction controls between the control samples (negative control and positive control) and the clinical samples, due to the extraction process.

For samples at the limit of detection (LOD) or negative with a value of Ct for the extraction control ≥ 35 , it is recommended to filter the sample, or dilute the extracted (1:10 and 1:100) to avoid possible interference and inhibitors in the amplification reaction. It is recommended to review the instructions for using the extraction process used by the user.

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 West Nile Virus either by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and West Nile Virus Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.

11. Quality control

VIASURE *West Nile Virus* 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 Extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit was tested using 28 samples (26 serum and 2 urine samples) from symptomatic patients. The results were compared with those obtained by commercial Real Time RT-PCR kit (RealStar® WNV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)). None of 28 samples were positive for West Nile Virus by Real Time PCR assays.

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with different EQA panels (QCMD and INSTAND). These panels consist of 60 clinical specimens dissolved in transport medium. The results were compared with those presented by EQA programme final reports. All West Nile Virus (44/60) 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) could be confirmed as a negative.

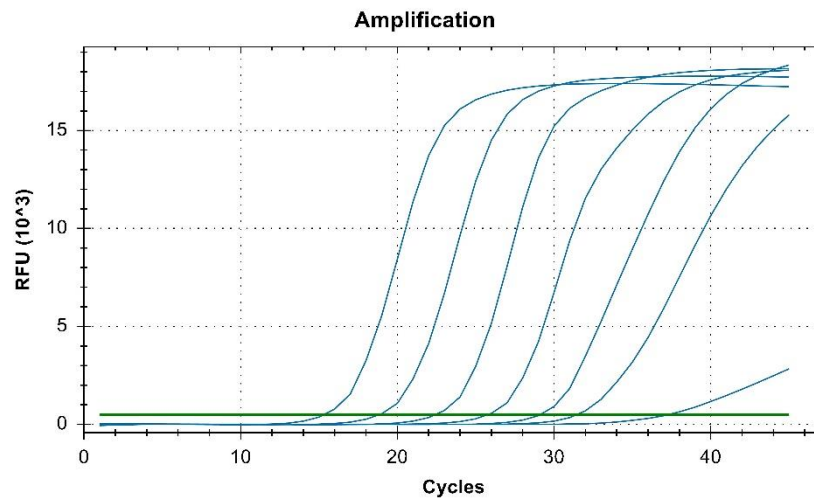
The results show a high sensitivity and specificity to detect West Nile virus using VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction. (Figure 2).



Figure 2. Dilution series of West Nile Virus (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the West Nile virus assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common arbovirus. No cross-reactivity was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Zika virus strain MR 766	-	Dengue 3 virus strain H87	-
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Dengue 4 virus strain H241	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	Yellow Fever virus strain 17D	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit was evaluated against West Nile virus H160/99, Heja, Ug37 and NY99 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 ⁽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⁾

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 ⁽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) 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 *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica del virus West Nile en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por virus West Nile. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por el virus West Nile 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 una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar virus West Nile.

2. Introducción y explicación

Desde que se aislara inicialmente en Uganda en 1937 hasta ahora, el virus del Nilo occidental (West Nile Virus, WNV) se ha propagado a una vasta región del mundo y hoy en día 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 Virus del Nilo Occidental tiene un genoma de RNA de sentido positivo que codifica una sola poliproteína que es co- y post-traduccionalmente escindida en 3 proteínas estructurales y en 7 no estructurales. 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.



3. Procedimiento

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico del virus West Nile 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 del virus West Nile 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 secuencia conservada de la región genómica 5'UTR.

VIASURE *West Nile Virus* 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 *West Nile Virus* 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) polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede adicionarse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación el virus West Nile se detecta en el canal FAM y el control de extracción (CE) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos y por tanto comercializar en múltiples formatos. La Tabla 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
West Nile Virus 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
West Nile Virus Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-WNV106LE, VS-WNV106HE, VS-WNV112LE y VS-WNV112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
West Nile Virus 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
West Nile Virus Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-WNV113LE y VS-WNV113HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
West Nile Virus 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	9/18 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
West Nile Virus Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	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
4-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	9/18 tiras de 4 tapones

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-WNV136E y VS-WNV172E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0.1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).



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 *West Nile Virus* 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.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ 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-WNV113LE, VS-WNV113HE, VS-WNV136E y VS-WNV172E). 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.
- Para referencias VS-WNV136E y VS-WNV172E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas así como para evitar la contaminación.
- 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.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

8.1. Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.



Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *West Nile Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

8.2. Extracción de RNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Si el Control de Extracción se utiliza para monitorizar el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de la posible inhibición de la PCR, añadir 5 µL del CE a la muestra o a la mezcla del tampón de lisis-muestra. (muestras clínicas, control positivo y/o negativo). Cerrar cada uno de los tubos y mezclar con la ayuda del vórtex durante 10 segundos.

Si el Control de Extracción se emplea sólo como control de inhibición de la PCR, añadir 1 µL de CE a la mezcla de reacción reconstituida.

Para la extracción de RNA a partir muestras de clínicas (suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, y otras), 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.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado QIAcube instrument (Qiagen).

8.3. Control positivo liofilizado

El vial de *West Nile Virus* 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 *West Nile Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 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 re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.4. 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.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.



Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de RNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *West Nile Virus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos, o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

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

Ciclos	Etapas	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 (West Nile Virus) y HEX, JOE o VIC (Control de Extracción). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, y Stratagene Mx3005PTM Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de virus West Nile. Comprobar la emisión de la señal del Control de Extracción (CE) para verificar el proceso de extracción y 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. Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:



West Nile Virus (FAM)	Control de extracción (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	West Nile Virus Positivo
-	+	-	+	West Nile Virus Negativo
-	-	-	+	Inválido
+	+	+	-	Inválido

Tabla 5. Interpretación

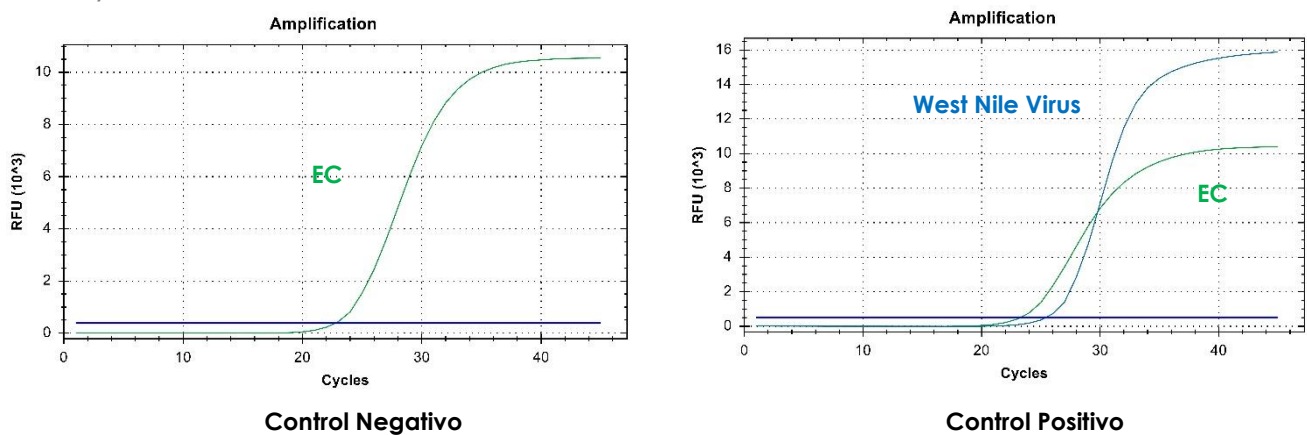
+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el Control de Extracción muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del Control Extracción 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 de Extracción si la presenta. Un fallo en el proceso de extracción y la inhibición de la reacción de PCR pueden ser excluidas por la amplificación del Control de Extracción.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del 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 ambos, el Control de Extracción y de la muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas durante la purificación de los ácidos nucleicos de y/o 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.



En los controles de extracción se pueden observar diferencias en los valores de Ct entre las muestras control (control negativo y control positivo) y las muestras clínicas, debido al proceso de extracción.

Para muestras en el límite de detección (LOD) o muestras negativas con un valor de Ct para el control de extracción ≥ 35 , se recomienda filtrar la muestra, o diluir el extraído (1:10 and 1:100) para evitar las posibles interferencias e inhibidores en la reacción de amplificación. Conviene revisar las instrucciones de uso del proceso de extracción empleado por el usuario.

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 virus West Nile 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.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *West Nile Virus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos de debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

11. Control de calidad

VIASURE *West Nile Virus*.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 de extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El test VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit fue evaluado con 28 muestras (26 de suero y 2 de orina) de pacientes sintomáticos. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RealStar® WNV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)). Ninguna de las 28 muestras analizadas resultó positiva para el virus West Nile mediante los ensayos de PCR a Tiempo Real.



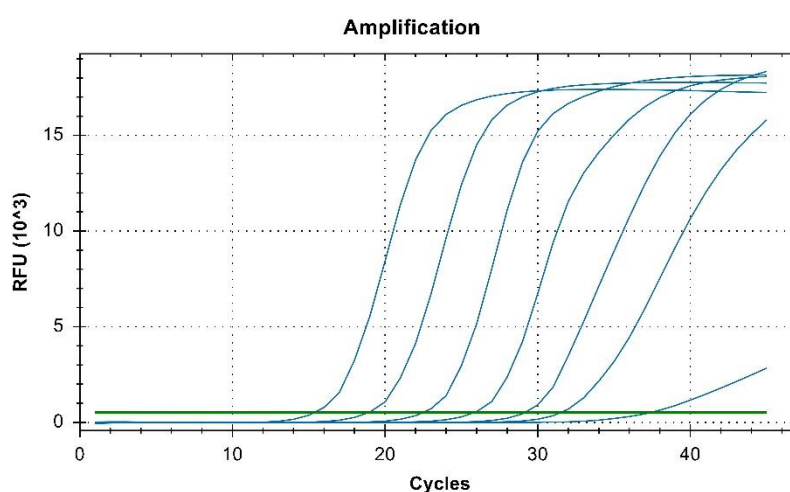
VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con diferentes paneles de muestras EQA (QCMD e INSTAND). Estos paneles se componen de un total de 60 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte. Los resultados se compararon con los informes finales de los programas EQA para la detección de virus West Nile. Todas las muestras positivas para virus West Nile (44/60) 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) pudieron ser confirmadas como negativas.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar virus West Nile utilizando VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción. (Figura 2).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar de West Nile Virus. (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo del virus West Nile 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.

Prueba de reacción cruzada			
Zika virus strain MR 766	-	Dengue 3 virus strain H87	-
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	Dengue 4 virus strain H241	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	Yellow Fever virus strain 17D	-

Tabla 6. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a las cepas de virus West Nile H160/99, Heja, Ug37 y NY99, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Chancey *et al.* The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International* 2015; 2015:376230.
2. A. Rizzoli *et al.* The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance* 2015; 20(20): 21135.
3. 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.
4. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus (<https://www.cdc.gov/westnile/>).

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

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



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™ / CFX96™ 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) y transvasar a los tubos específicos 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 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 Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
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™, StepOnePlus™ 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: February 2021









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



CE

IVD



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC