

VIASURE

Real Time PCR Detection Kits

by CerTest
BIOTEC

Dengue Serotyping

Handbook for the following references/

Manual para las siguientes referencias:

VIASURE Dengue Serotyping Real Time PCR Detection Kit

VS-DES148T



ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification of Dengue virus serotypes (DEN-1 to -4) in clinical samples from patients with signs and symptoms of Dengue virus infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis and serotyping of the Dengue 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 each Dengue virus serotype (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and/or DEN-4).

2. Summary and Explanation

Dengue virus (DENV) is a small single-stranded RNA virus comprising mainly four distinct serotypes (DEN-1 to -4). These closely related serotypes of the dengue virus belong to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*, and are transmitted by *Aedes* sp. mosquitoes. An estimated 50 million dengue infections occur annually and approximately 2.5 billion people live in dengue endemic countries. In non-endemic countries, dengue is one of the causes of febrile illness among travellers returning from tropical or subtropical areas of the Caribbean, Latin America and Asia.

After an incubation period of 4-10 days, infection by any of the four virus serotypes can produce a wide spectrum of clinical manifestations spanning asymptomatic infection, dengue fever (DF), and severe dengue, a category that includes entities previously classified as dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Primary infection is thought to induce lifelong protective immunity to the infecting serotype. However, infection with one serotype of DENV confers only short-lived immunity against heterologous serotypes, after that a secondary infection with any of the remaining serotypes has been shown to be a significant risk factor for the development of DHF or DSS. In particular, "Asian" genotypes of DEN-2 and DEN-3 are frequently associated with severe disease accompanying secondary dengue infections.

Given the geographic expansion of DENV1-4, rapid and accurate serotyping of DENV is crucial for dengue diagnosis and epidemiologic surveillance, treatment of patients, control of DENV outbreaks and transmission-blocking strategies targeting the vector, as well as for development of vaccines and antivirals. Thus, this two tube multiplex Real Time RT-PCR assay can be used as a method for differential diagnosis of a specific DEN serotype in viremic dengue patients during the early phase of the infection.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis and serotyping of the Dengue 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 region of the *NS5* gene (Dengue serotype 1 (DEN-1)), *envelope* gene (Dengue virus serotype 2 (DEN-2)), *prM* gene (Dengue serotype 3 (DEN-3)) and *prM* gene (Dengue serotype 4 (DEN-4)), using specific primers and a fluorescent-labelled probe.



VIASURE *Dengue Serotyping* 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 target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase, retrotranscriptase) in an stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes two kind of reaction mix and each one corresponds to one different assay. The first reaction mix contains the multiplex reaction mix for the detection of DEN-1 and/or DEN-4 (*Dengue Serotyping 1+4* 4/8-well strips). DEN-1 Virus RNA targets are amplified and detected in FAM channel and DEN-4 Virus RNA targets are amplified and detected in ROX channel. The second reaction mix contains the multiplex reaction mix for the detection of DEN-2 and/or DEN-3 (*Dengue Serotyping 2+3* 4/8-well strips). DEN-2 Virus RNA targets are amplified and detected in ROX channel, DEN-3 Virus RNA targets are amplified and detected in FAM channel. Both multiplex reactions contain an internal control (IC) which is amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2).

4. Reagents provided

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Dengue Serotyping 1+4</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	2 vials
<i>Dengue Serotyping 2+3</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Dengue Serotyping</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-DES148T.

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 *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips (if available).



- Vortexer.
- Micropipettes (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.

VIASURE *Dengue Serotyping* 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.
- Store the kit at 2-40°C until expiration date stated in the label, except the rehydrated Reaction-Mix tube. Once the *Dengue Serotyping* Reaction-Mix tubes have been reconstituted, it may be kept them at 25°C±5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, we recommend store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).
- The rehydrated Reaction-Mix should be recapped and stored inside the pouch with desiccant material in order to protect from light and humidity.
- 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). 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.



- 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.
- Make sure to use a well for the detection of Dengue Serotyping 1+4 and another well for Dengue Serotyping 2+3 assay. Be careful not to mix them throughout the process.
- 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. RNA extraction

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

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

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- Maxwell®RSC Blood DNA Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

8.2. Lyophilized positive control

Dengue Serotyping 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 *Dengue Serotyping* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

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



8.3. Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Dengue Serotyping* Reaction-Mix tubes in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

8.4. PCR protocol

1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Dengue Serotyping* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA extracted from each sample, reconstituted *Dengue Serotyping* Positive Control (red vial) or

Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. It is recommended to centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tube 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 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Dengue 1 and 3), ROX (Dengue 2 and 4) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select



the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for 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 *Dengue Serotyping* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

Using the following table read and analyse the results:

Interpretation of results for **first multiplex reaction mix for the detection of DEN-1 and/or DEN-4:**

DEN-1 Virus (FAM)	DEN-4 Virus (ROX)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Dengue serotypes 1 and 4 Positive
-	-	+	-	+	Dengue serotypes 1 and 4 Negative
+	-	+/-	-	+	Dengue serotype 1 Positive and Dengue serotype 4 Negative
-	+	+/-	-	+	Dengue serotype 4 Positive and Dengue serotype 1 Negative
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

+: Amplification curve

-: No amplification curve



Interpretation of results for **second multiplex reaction mix for the detection of DEN-2 and/or DEN-3:**

DEN-2 Virus (ROX)	DEN-3 Virus (FAM)	Internal control (HEX)	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	Dengue serotypes 2 and 3 Positive
-	-	+	-	+	Dengue serotypes 2 and 3 Negative
+	-	+/-	-	+	Dengue serotype 2 Positive and Dengue serotype 3 Negative
-	+	+/-	-	+	Dengue serotype 3 Positive and Dengue serotype 2 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 internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal 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 internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (Multiplex reaction mix DEN-1+DEN-4).

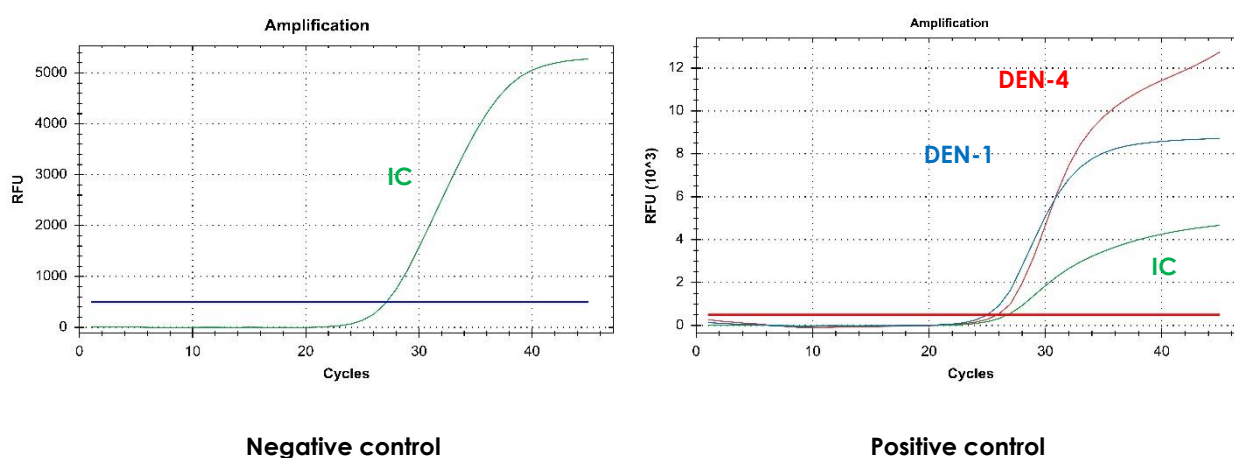
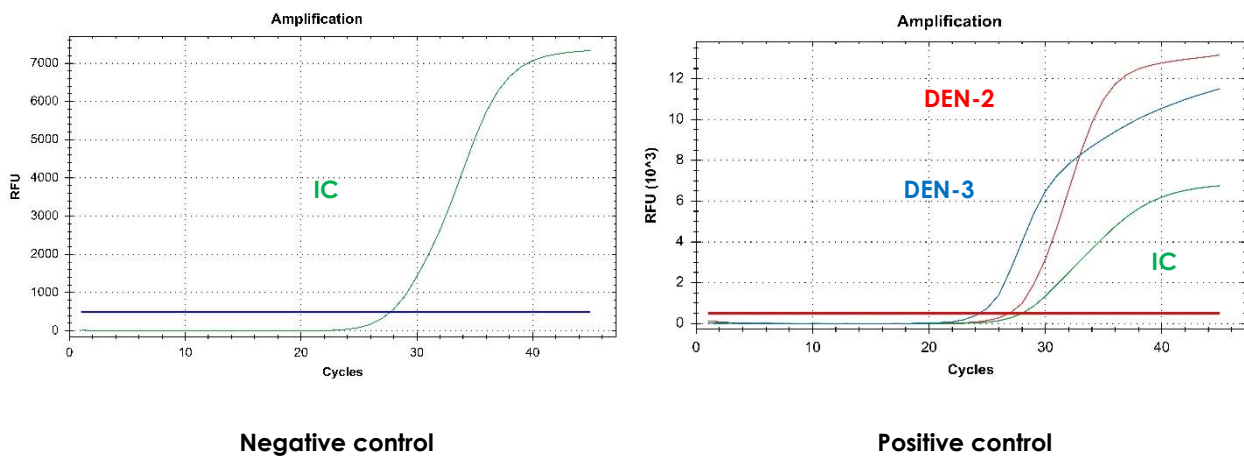


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (Multiplex reaction mix DEN-2+DEN-3).



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

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

10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples it has been validated only with RNA extracted from serum 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 *Dengue Serotyping* Positive Control, either by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.



11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit (for Dengue virus) was evaluated with QCMD 2014 and QCMD 2016 panels from Dengue Virus EQA Programme.

The QCMD 2014 and QCMD 2016 Dengue panels consist of 12 and 10 clinical specimens dissolved in transport medium, respectively. The results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RealStar® Dengue RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)) and Dengue Virus 2014 and 2016 EQA programme final reports. All Dengue Virus Type 1, 2, 3 and 4 samples could be detected, and the serotypes were correctly identified. In addition, DENV Negative and Non-DENV flaviviruses samples from QCMD 2014 (which include Japanese Encephalitis virus/ West Nile Virus (NY99)/ Tick borne Encephalitis virus/ Yellow Fever virus) and from QCMD 2016 samples (which include Zika Virus at least) could be confirmed as a negative.

The results show a high sensitivity and specificity to detect four serotypes of Dengue virus using VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of ≥ 10 RNA copies per reaction (Figure 3, 4, 5 and 6).

Figure 3. Dilution series of Dengue Serotype 1 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix DEN-1+DEN-4, channel FAM).

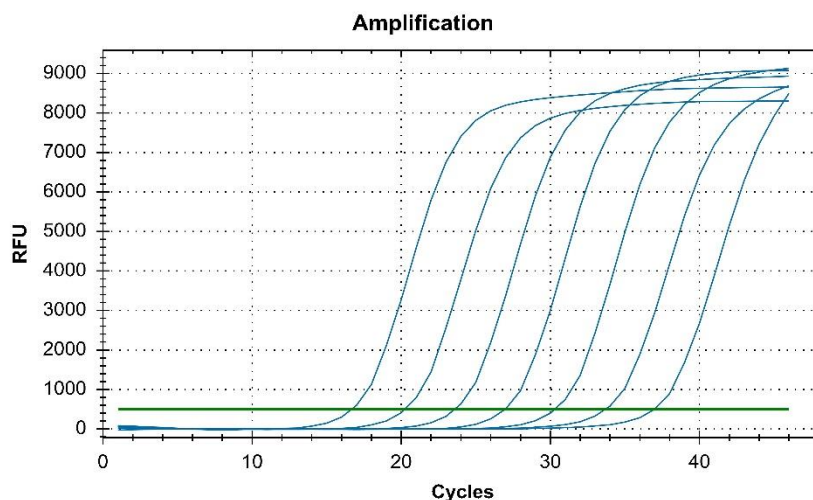


Figure 4. Dilution series of Dengue Serotype 4 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix DEN-1+DEN-4, channel ROX).

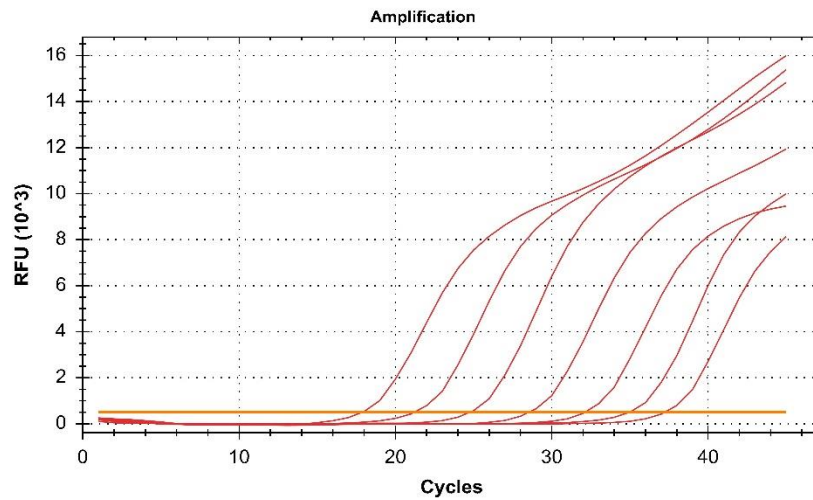


Figure 5. Dilution series of Dengue Serotype 2 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix DEN-2+DEN-3, channel ROX).

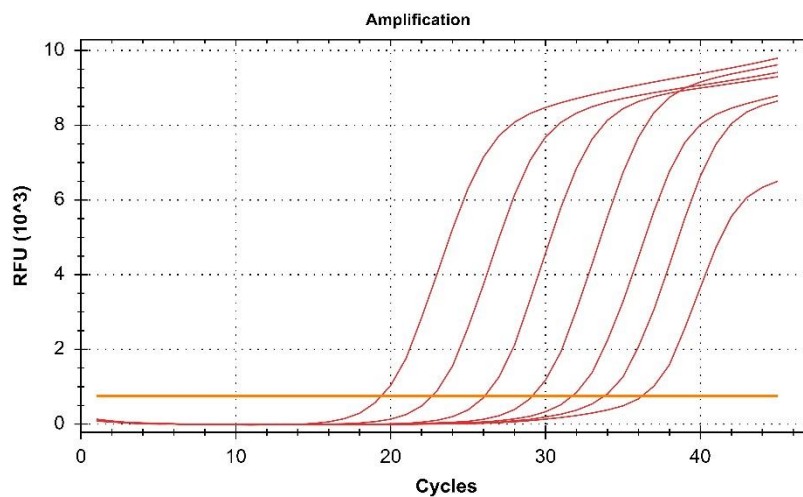
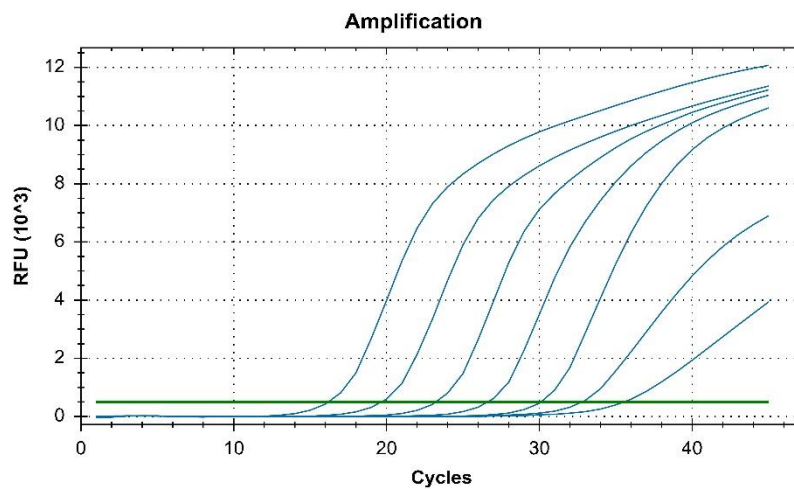


Figure 6. Dilution series of of Dengue Serotype 3 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Multiplex reaction mix DEN-2+DEN-3, channel FAM).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Dengue Serotyping* assay was confirmed by testing a panel consisting of different microorganisms representing the most common arboviruses. No cross-reactivity was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	West Nile virus Heja	-
Zika virus strain MR 766	-	West Nile virus Ug37	-
St Louis Encephalitis virus strain 17D	-	Yellow Fever virus strain 17D	-
West Nile virus strain H160/99	-		

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against Dengue 1 virus strain Hawaii, Dengue 2 virus strain New Guinea C, Dengue 3 virus strain H87 and Dengue 4 virus strain H241, 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 Cyclers (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 *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica de los serotipos de virus Dengue (DEN-1 a -4) en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por el virus Dengue. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico y serotipado del virus Dengue 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 cada serotipo del virus Dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y/o DEN-4).

2. Introducción y explicación

El virus del Dengue (DENV) es un virus de RNA de cadena simple que comprende cuatro serotipos distintos (DEN-1 a -4). Estos serotipos del virus del Dengue están estrechamente relacionados y pertenecen al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*, y se transmiten a través del mosquito *Aedes* sp. Se estima que cada año se producen 50 millones de infecciones por Dengue y aproximadamente unas 2,5 billones de personas viven en países donde el Dengue es endémico. En el resto de países, el Dengue es una de las causas de enfermedad febril entre los viajeros que regresan de áreas subtropicales del Caribe, Latinoamérica y Asia.

Tras un periodo de incubación de 4 a 10 días, la infección causada por cualquiera de los cuatro serotipos del virus puede producir un amplio espectro de manifestaciones clínicas que abarcan desde infecciones asintomáticas, fiebre del Dengue (FD), Dengue grave, una categoría que incluye a las entidades anteriormente clasificadas como fiebre hemorrágica del Dengue (DHF) y síndrome de shock por Dengue (DSS). Se cree que la infección primaria induce una inmunidad protectora de por vida contra el serotipo infectante. Sin embargo la infección por un determinado serotipo de Dengue, confiere solamente inmunidad a corto plazo frente a los otros serotipos heterólogos. Habiéndose demostrado que una infección secundaria con cualquiera de los serotipos restantes puede ser un factor de riesgo significativo para el desarrollo de DHF y DSS. En concreto, los genotipos asiáticos de DEN-2 y DEN-3 se han asociado frecuentemente con el desarrollo de la forma grave de la enfermedad que acompaña a infecciones secundarias de Dengue.

Teniendo en cuenta la expansión geográfica de DENV1-4, el serotipado rápido y precisa de DENV es crucial para el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica, el tratamiento de los pacientes, el control de los brotes y el desarrollo de estrategias para bloquear la transmisión de DENV a través del control de su vector, así como para el desarrollo de vacunas y antivirales. Esta PCR multiplex a tiempo real en dos tubos puede utilizarse como un método para el diagnóstico diferencial de un serotipo de DEN específico en pacientes con Dengue durante la fase virémica temprana de la infección.



3. Procedimiento

VIASURE Dengue Serotyping Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico y serotipado del virus Dengue 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 Dengue se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región conservada del gen *NS5* (serotipo Dengue 1 (DEN-1)), gen *envelope* (serotipo Dengue 2 (DEN-2)), gen *prM* (serotipo Dengue 3 (DEN-3)) y gen *prM* (serotipo Dengue 4 (DEN-4)).

VIASURE Dengue Serotyping 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 Dengue Serotyping Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Cada kit incluye dos tipos de tubos y cada uno de ellos corresponde a un ensayo diferente. El primer tubo contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de DEN-1 y/o DEN-4 (*Dengue serotyping 1+4 4/8-well strips*). El segundo tubo contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de DEN-2 y/o DEN-3 (*Dengue serotyping 2+3 4/8-well strips*). Tras la reacción de amplificación los serotipos 1 y 3 del virus Dengue se detectan en el canal FAM, los serotipo 2 y 4 del virus Dengue se detectan en el canal ROX y el control interno (CI) 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 Dengue Serotyping Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1.



Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Dengue Serotyping 1+4</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
<i>Dengue Serotyping 2+3</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
<i>Dengue Serotyping</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-DES148T.

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 *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit.

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

VIASURE *Dengue Serotyping* 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 los kits de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, excepto el tubo de Reaction-Mix rehidratado. Una vez los viales *Dengue Serotyping* Reaction-Mix han sido reconstituidos pueden mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).
- El vial con la mezcla de reacción rehidratada que no se utilice, se debe cerrar y almacenar en el interior del pouch con el material desecante para protegerlo de la luz y la humedad.
- 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). 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.
- 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.



- Asegurarse de usar un pocillo para la detección de Dengue Serotyping 1+4 y otro para el ensayo de Dengue Serotyping 2+3. Tener precaución para que no se mezclen durante el proceso.
- 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. 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.

Para la extracción de RNA a partir muestras de clínicas (sangre, suero, plasma, saliva, orina, tejidos 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.
- Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).
- Maxwell® RSC Blood DNA Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Dengue Serotyping* 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 *Dengue Serotyping* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.



Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C . Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ o $2-8^{\circ}\text{C}$ hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

8.4. Protocolo PCR

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 μL de *Dengue Serotyping* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 μL de RNA extraído de cada muestra, de *Dengue Serotyping* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Se recomienda centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos 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 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (serotipos 1 y 3 del virus Dengue), ROX (serotipos 2 y 4 del virus Dengue) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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 Mx3005P™ 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 *Dengue Serotyping*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Con ayuda de las siguientes tablas, leer y analizar los resultados:

Interpretación de los resultados para **primera mezcla de reacción multiplex para DEN-1 y/o DEN-4:**

Virus DEN-1 (FAM)	Virus DEN-4 (ROX)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Serotipos 1 y 4 de Dengue Positivos
-	-	+	-	+	Serotipos 1 y 4 de Dengue Negativos
+	-	+/-	-	+	Serotipo 1 de Dengue Positivo y Serotipo 4 de Dengue Negativo
-	+	+/-	-	+	Serotipo de Dengue 4 Positivo y Serotipo de Dengue 1 Negativo
+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	Inválido

Tabla 4. Interpretación

+: curva de amplificación

-: sin curva de amplificación

Interpretación de los resultados para **segunda mezcla de reacción multiplex para DEN-2 y/o DEN-3:**

Virus DEN-2 (ROX)	Virus DEN-3 (FAM)	Control Interno (HEX)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Serotipos 2 y 3 de Dengue Positivos
-	-	+	-	+	Serotipos 2 y 3 de Dengue Negativos
+	-	+/-	-	+	Serotipo 2 de Dengue Positivo y Serotipo 3 de Dengue Negativo
-	+	+/-	-	+	Serotipo de Dengue 3 Positivo y Serotipo de Dengue 2 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 interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.



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

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 (Mezcla de reacción multiplex de DEN-1+DEN-4).

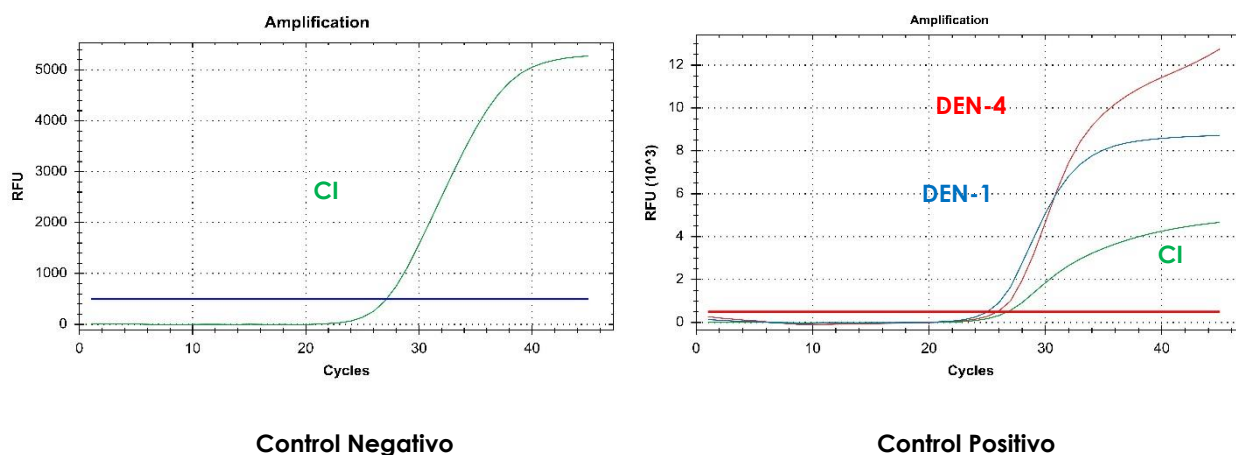
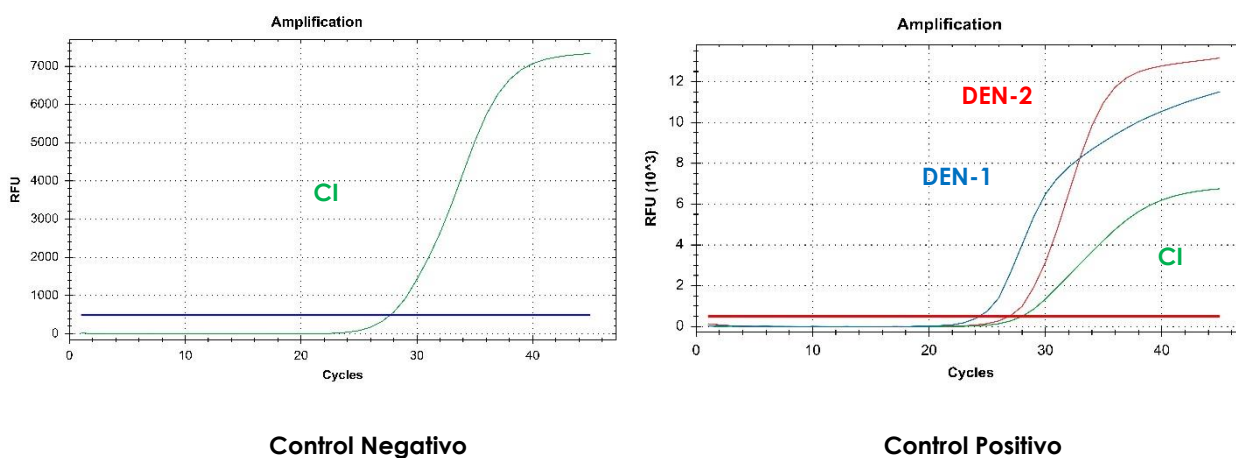


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex de DEN-2+DEN-3).



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

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

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



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con RNA extraído de muestras de suero.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe 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 *Dengue Serotyping* Positive Control ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit (para virus Dengue) se evaluó con el panel de muestras que la organización QCMD dispuso en el año 2014 y 2016 para la evaluación del virus Dengue como parte del programa de Evaluación Externa de la calidad (EEC).

Estos paneles se componen de 12 y 10 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte, respectivamente. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RealStar® Dengue RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)) y los informes finales del programa EEC para la detección de Virus Dengue en los años 2014 y 2016. Todas las muestras del virus Dengue serotipos 1-4 pudieron ser detectadas. Además, tanto la muestra Dengue negativa como la Dengue negativa pero positiva para otros flavivirus del panel de QCMD 2014, (la cual incluye el Virus de la Encefalitis Japonesa, el Virus West Nile (WNT) cepa (NY99), Encefalitis transmitida por garrapatas, Virus de la Fiebre Amarilla) así como las muestras del panel de QCMD 2016 (las cuales al menos incluían el Virus Zika) pudieron ser confirmadas como negativas.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los cuatro serotipos del virus Dengue utilizando VIASURE *Dengue Serotyping* Real Time PCR Detection Kit.



12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Dengue Serotyping Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA por reacción. (Figura 3, 4, 5 y 6).

Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar del serotipo 1 del virus Dengue (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex DEN-1+DEN-4, canal FAM).

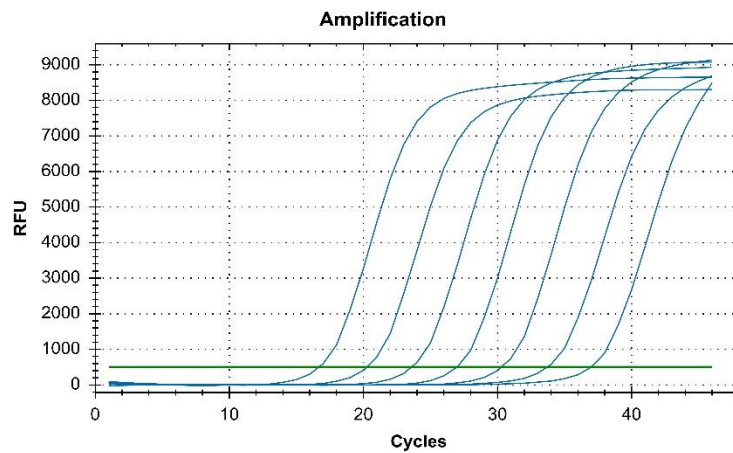


Figura 4. Diluciones seriadas de un estándar del serotipo 4 del virus Dengue (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex DEN-1+DEN-4, canal ROX).

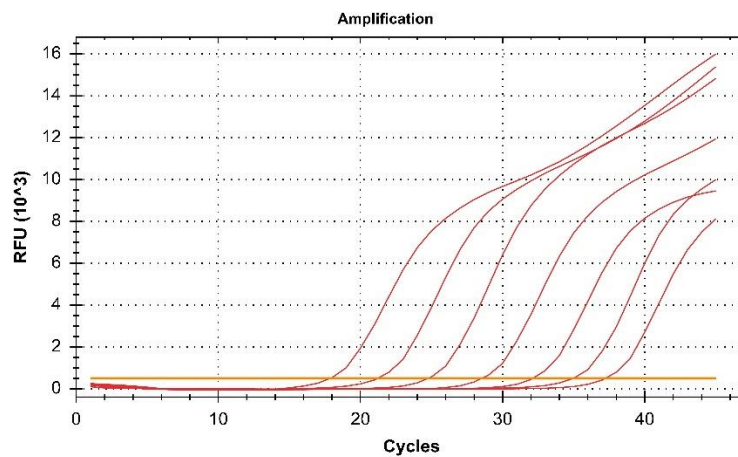


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del serotipo 2 del virus Dengue (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex DEN-2+DEN-3, canal ROX).

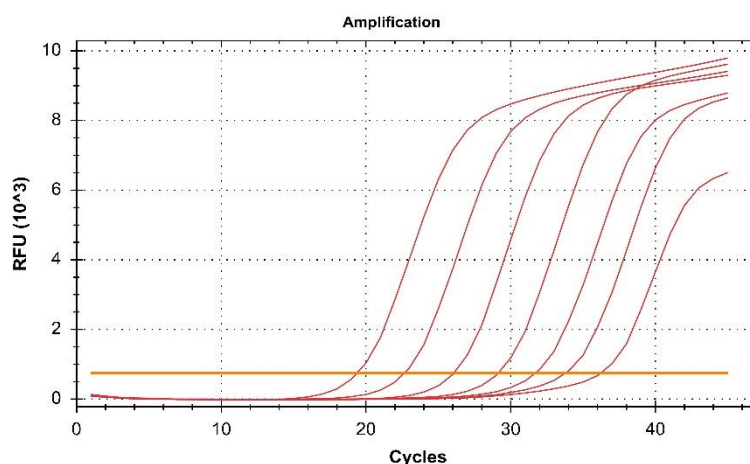
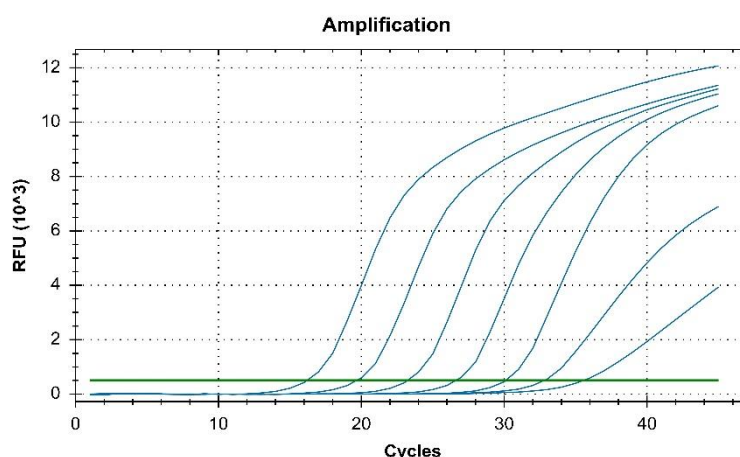


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar del serotipo 3 del virus Dengue (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Mezcla de reacción multiplex DEN-2+DEN-3, canal FAM).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Dengue Serotyping* 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			
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus West Nile Heja	-
Virus Zika cepa MR 766	-	Virus West Nile Ug37	-
Virus de la encefalitis de San Luis cepa 17D	-	Virus de la fiebre amarilla cepa 17D	-
Virus West Nile cepa H160/99	-		

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

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE Dengue Serotyping Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a virus Dengue 1 cepa Hawaii, Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea, Virus Dengue 3 cepa H87 y Virus Dengue 4 cepa H241, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. G.A. Santiago *et al.* Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. PLOS Neglected Tropical Diseases 2013; 7(7):e2311.
2. S.K. Mardekian and A.L. Roberts. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. BioMed Research International 2015: 834371.
3. E. Alm *et al.* One-step real-time RT-PCR assays for serotyping dengue virus in clinical samples. BMC Infectious Diseases 2015; 15:493.
4. J.J. Waggoner *et al.* Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. PLOS Neglected Tropical Diseases 2013; 7(4): e2116.
5. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: World Health Organization; 2009. Epidemiology, burden of disease and transmission. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143159/>).
6. Centers for Disease Control and Prevention. Dengue (<http://www.cdc.gov/dengue/>).
7. World Health Organization. Dengue (<http://www.who.int/topics/dengue/en/>).

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

	In vitro 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