

# REAL TIME PCR DETECTION KIT

## *Zika, Dengue & Chikungunya*

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

VIASURE <i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-ZDC106L
VIASURE <i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-ZDC106H
VIASURE <i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-ZDC112L
VIASURE <i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-ZDC112H
VIASURE <i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-ZDC113L
VIASURE <i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-ZDC113H

VIASURE



## ENGLISH

## 1. Intended of use

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific detection and differentiation of Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses in clinical samples from patients with signs and symptoms of Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Zika and Dengue and Chikungunya viruses.

## 2. Summary and Explanation

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

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

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

## 3. Principle of the procedure

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses in clinical samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of the *envelope* gene (ZIKV), 3'Non coding region (DENV) and *NSP1* gen (CHIKV), using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

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

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

#### 4. Reagents provided

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-ZDC1SL/ VS-ZDC1SH	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPS, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	6/12 X 8-well strip
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-ZDC1C	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-ZDC106L, VS-ZDC106H, VS-ZDC112L and VS-ZDC112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-ZDC1PL/ VS-ZDC1PH	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPS, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1 plate
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
VS-ZDC1C	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
VS-NC1	Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNAse/DNAse free	Water RNAse/DNAse free	White	1 vial x 1 mL
VS-OCS	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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-ZDC113L and VS-ZDC113H.

## 5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes materials that are required for using but not included in the VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler) (to check compatibility see Annex I).
- RNA extraction kit.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes.
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L).
- Filter tips.
- Powder-free disposal gloves.

## 6. Transport and storage conditions

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

## 7. Precautions for users

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- 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 disposal 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 reagents and materials that have been exposed to the samples and 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.

## 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, 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.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, using QIAcube instrument (Qiagen).
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

*Zika, Dengue & Chikungunya Virus* Positive Control contains high copies template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Zika, Dengue & Chikungunya Virus* Positive Control (red vial) adding 100 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

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

8.3. 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. 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 RNA sample, reconstituted *Zika, Dengue & Chikungunya Virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up your thermocycler.

Program your thermocycler following the conditions 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 Cy5 (*Zika virus*), FAM (*Dengue*), ROX (*Chikungunya*) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

## 9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in negative control well and the presence of signal for Zika, Dengue and Chikungunya viruses 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 itself of the used real time PCR equipment according to manufacturer’s instructions.

Using the following table read and analyze the results:

Zika Virus	Dengue Virus	Chikungunya Virus	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Zika , Dengue and Chikungunya viruses Positive
-	-	-	+/-	-	+	Zika, Dengue and Chikungunya viruses Negative
+	-	-	+/-	-	+	Zika Virus Positive, Dengue and Chikungunya Viruses Negative
+	+	-	+/-	-	+	Zika and Dengue Viruses Positive, and Chikungunya Virus Negative
+	-	+	+/-	-	+	Zika and Chikungunya Viruses Positive, and Dengue Virus Negative
-	+	-	+/-	-	+	Dengue Virus Positive, Zika and Chikungunya Viruses Negative
-	+	+	+/-	-	+	Dengue and Chikungunya Viruses Positive, Zika Virus Negative
-	-	+	+/-	-	+	Chikungunya Virus Positive, Zika and Dengue Viruses Negative
+	+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	-	Experiment fail

Table 4. Sample interpretation

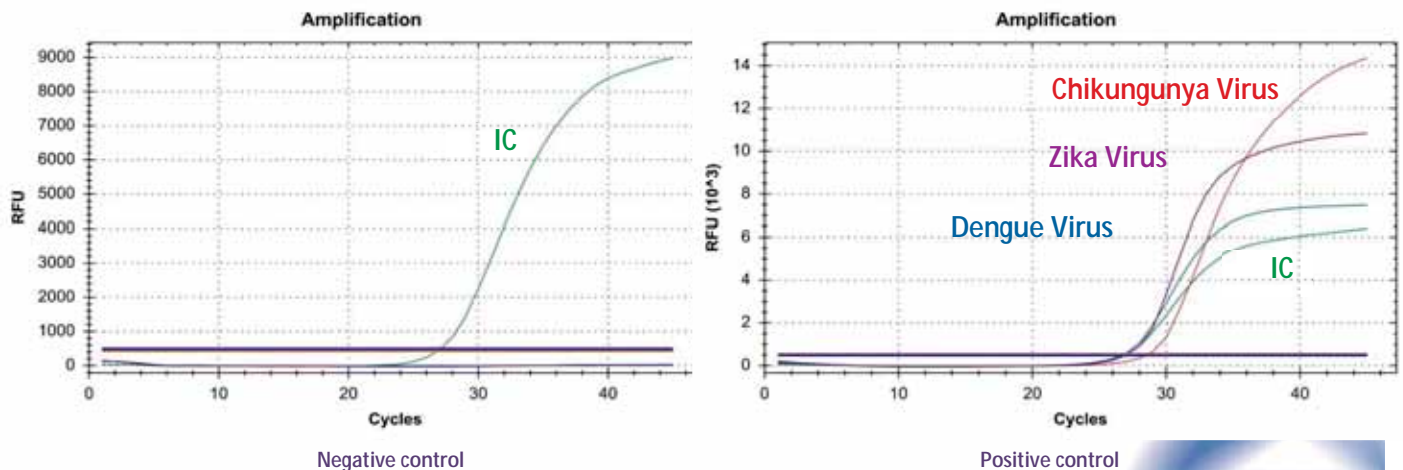
+: Amplification curve

-: 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 Touch™ 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 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.

## 10. Limitations of the test

- The result of the test should be evaluated by a health care professional and evaluated 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 serum and urine samples.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Zika, Dengue and/or Chikungunya viruses, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## 11. Quality control

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* 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. ANALYTICAL SENSITIVITY

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 10$  RNA copies per reaction for ZIKV, DENV and CHIKV (Figure 2, 3 and 4).

Figure 2. Dilution series of Zika Virus ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cy5 channel).

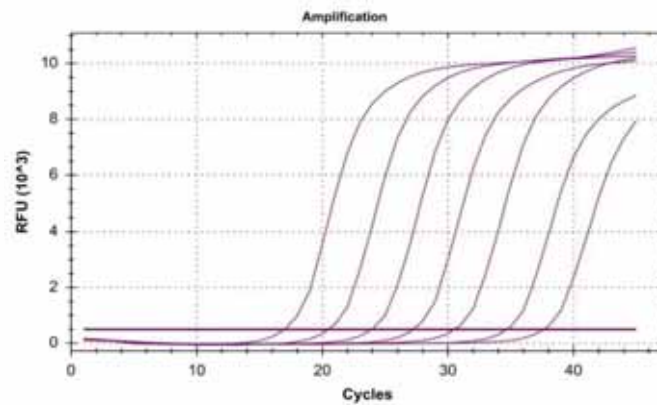


Figure 3. Dilution series of Dengue Virus ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (FAM channel).

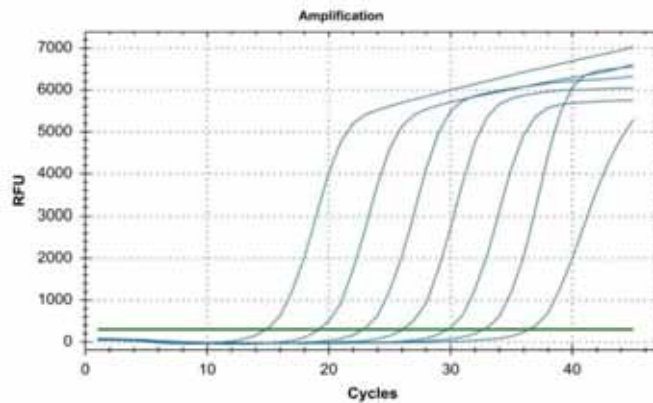
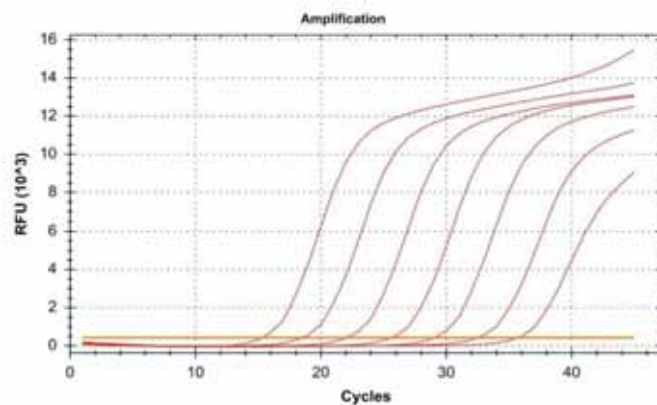


Figure 4. Dilution series of Chikungunya Virus ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (ROX channel).





## 12.2. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the Zika, Dengue and Chikungunya viruses assays were confirmed by testing a panel consisting of 10 different microorganisms representing the most common arbovirus.

No cross-reactivity of Zika Virus was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	West Nile virus strain H160/99	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	West Nile virus Heja	-
Dengue 3 virus strain H87	-	West Nile virus Ug37	-
Dengue 4 virus strain H241	-	Yellow Fever virus strain 17D	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

No cross-reactivity of Dengue Virus 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 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

No cross-reactivity of Chikungunya Virus was detected against any of the following microorganisms tested.

Cross-reactivity testing			
Zika virus strain MR 766	-	St Louis Encephalitis virus strain 17D	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	West Nile virus strain H160/99	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	West Nile virus Heja	-
Dengue 3 virus strain H87	-	West Nile virus Ug37	-
Dengue 4 virus strain H241	-	Yellow Fever virus strain 17D	-

Table 8. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

## 12.3. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit for Zika Virus was evaluated against Zika virus strain MR 766 showing positive results.

The reactivity of VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit for Dengue Virus 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.

The reactivity of VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit for Chikungunya was evaluated against Chikungunya virus S27 Petersfield showing positive results.

ANNEX 1:

**COMPATIBILITY OF THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT**

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with low profile block, like systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with high or regular profile block, like 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
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
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™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®

Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS	
Manufacturer	Model
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene® Q*
Cepheid	SmartCycler®

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

\* The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

ANNEX 2:

**DETECTION CHANNELS OF MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT**

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

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	VIASURE CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation required
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/60	
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 ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

## ESPAÑOL

### 1. Uso previsto

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

### 2. Introducción y explicación

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

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

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

### 3. Procedimiento

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya en muestras clínicas. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación de los virus Zika, Dengue y/o

Chikungunya se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada del gen *envelope* (ZIKV), con la región 3' no codificante (DENV) y con el gen *NSP1* (CHIKV).

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación, el virus Zika se detecta en el canal Cy5, el virus Dengue se detecta en el canal FAM, el virus Chikungunya se detecta 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla 1 y Tabla 2:

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-ZDC1SL/ VS-ZDC1SH	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	6/12 tiras de 8 pocillos
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-ZDC1C	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ZDC106L, VS-ZDC106H, VS-ZDC112L, VS-ZDC112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-ZDC1PL/ VS-ZDC1PH	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> 96-well plate	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado	Blanco	1 placa
VS-RB02	Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1.8 mL
VS-ZDC1C	<i>Zika, Dengue &amp; Chikungunya Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
VS-NC1	Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
VS-H2O	Water RNase/DNAse free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
VS-OCS	Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-ZDC113L y VS-ZDC113H.

## 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (para comprobar la compatibilidad ver Anexo I).
- Kit de extracción de RNA.
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL.
- Vórtex.
- Micropipetas (0.5-20 µL, 20-200 µL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.

## 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.
- Proteger los componentes de la luz.

## 7. Precauciones para el usuario

- Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.

- 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.

## 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, orina, tejidos y otros), puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, using QIAcube instrument (Qiagen).
- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).

### 8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

El vial de *Zika, Dengue & Chikungunya 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 *Zika, Dengue & Chikungunya 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.

### 8.3. PROTOCOLO PCR

Determinar y separar 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. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

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

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Zika, Dengue & Chikungunya Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Centrifugar brevemente.

Colocar la placa o las tiras en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

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

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

Tabla 3. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales Cy5 (virus Zika), FAM (Virus Dengue), ROX (Virus Chikungunya) 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 y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada.

## 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 los virus Zika, Dengue y Chikungunya. 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 la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:



Zika Virus	Dengue Virus	Chikungunya Virus	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Virus Zika, Dengue y Chikungunya Positivos
-	-	-	+/-	-	+	Virus Zika, Dengue y Chikungunya Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Virus Zika Positivo, Virus Dengue y Chikungunya Negativos
+	+	-	+/-	-	+	Virus Zika y Dengue Positivos, Virus Chikungunya Negativo
+	-	+	+/-	-	+	Virus Zika y Chikungunya Positivos, Virus Dengue Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Virus Dengue Positivo, Virus Zika y Chikungunya Negativos
-	+	+	+/-	-	+	Virus Dengue y Chikungunya Positivos, Virus Zika Negativo
-	-	+	+/-	-	+	Virus Chikungunya Positivo, Virus Zika y Dengue Negativos
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

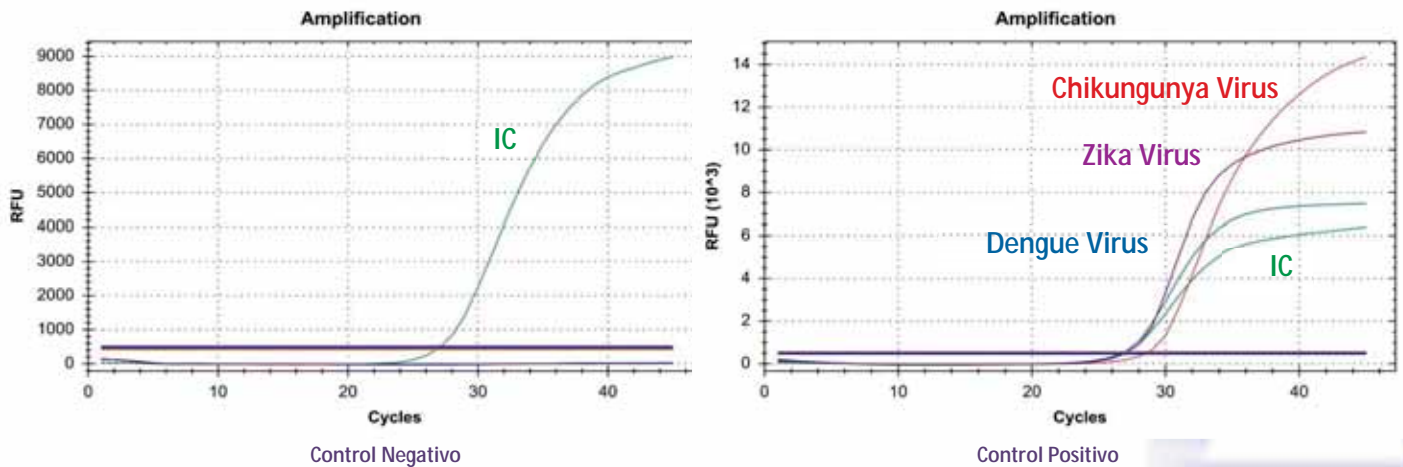
Tabla 4. Interpretación

+: 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 Touch™ Real-Time PCR Detection System.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo. En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

## 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 muestras de suero y orina.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el RNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con los virus Zika, Dengue y Chikungunya, 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 *Zika, Dengue & Chikungunya* 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 ANALÍTICA

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de RNA por reacción (Figura 2, 3 y 4).

Figura 2. Diluciones seriadas de Zika Virus ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal Cy5).

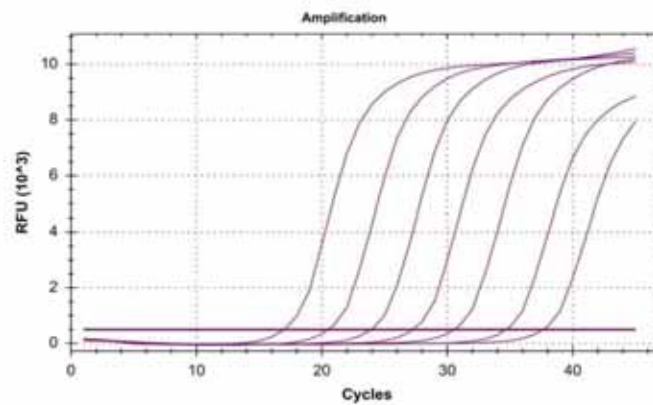


Figura 3. Diluciones seriadas de Dengue Virus ( $10^7$ - $10^1$  copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

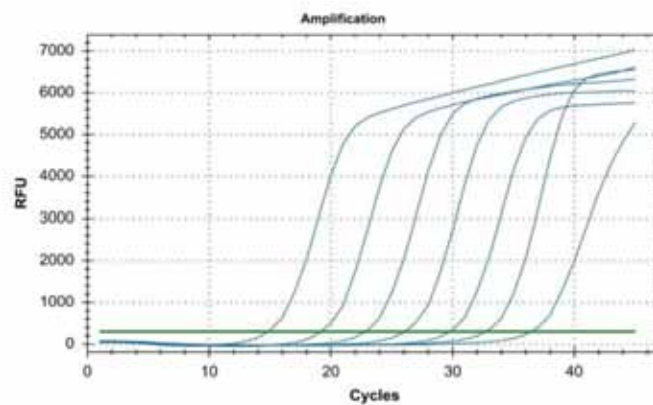
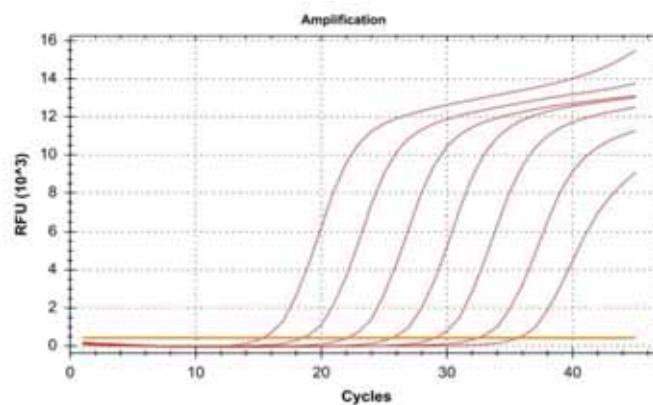


Figura 4. Diluciones seriadas de Chikungunya Virus ( $10^7$ - $10^1$  copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



## 12.2. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo de los virus Zika, Dengue y/o Chikungunya fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los arbovirus más comunes.

No se detectaron reacciones cruzadas de Virus Zika con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	Virus de la encefalitis de San Luis cepa 17D	-
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-	Virus West Nile cepa H160/99	-
Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea C	-	Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-
Virus Dengue 3 cepa H87	-	Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-
Virus Dengue 4 cepa H241	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-

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

No se detectaron reacciones cruzadas de Virus Dengue 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 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

No se detectaron reacciones cruzadas de Virus Chikungunya con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Zika cepa MR 766	-	Virus de la Encefalitis de San Luis cepa 17D	-
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-	Virus West Nile cepa H160/99	-
Virus Dengue 2 cepa New Guinea C	-	Virus West Nile Heja	-
Virus Dengue 3 cepa H87	-	Virus West Nile Ug37	-
Virus Dengue 4 cepa H241	-	Virus de la Fiebre Amarilla cepa 17D	-

Tabla 8. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio.

## 12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit para Virus Zika evaluó frente a la cepa de Virus Zika cepa MR 766, mostrando un resultado positivo










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

La reactividad de VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit para Virus Chikungunya se evaluó frente a Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield mostrando un resultado positivo.

### 13. Bibliography/Bibliografía

1. R.S. Lanciotti *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14(8): 1232-1239.
2. O. Faye *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology Journal* 2013; 10: 311.
3. A.C. Gourinat *et al.* Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Diseases* 2015; 21(1): 84-86.
4. D. Musso *et al.* Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology* 2015; 68: 53-55.
5. D. Musi *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerging Infectious Diseases* 2015 21(2): 359-361.
6. J. Mlakar. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine* 2016.
8. C. Drosten *et al.* Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(7): 2323-2330.
9. A. Dumoulin *et al.* Pan-dengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46(9): 3104-3106.
10. J. Liu *et al.* Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2016; 54(1): 49-58.
11. S.K. Mardekian and A.L. Roberts. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International* 2015: 834371.
12. K.A. Tsetsarkin *et al.* Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. *Current Opinion in Virology* 2016; 16: 143-150.
13. R.S. Lanciotti *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases journal* 2007; 13(5): 764-767.
14. Centers for Disease Control and Prevention. (<http://www.cdc.gov/>).
15. World Health Organization. (<http://www.who.int/>).

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

 IVD	<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	DIL	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
Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Fast Dx Real-Time PCR System
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™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Roche	LightCycler® 480 Real-Time PCR System
Roche	LightCycler® 96 Real-Time PCR System
Agilent Technologies	AriaMx Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
Abbott	Abbott m2000 RealTime System
BIONEER	Exicycler™ 96
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
Qiagen	Rotor-Gene®Q*
Cepheid	SmartCycler®

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

\* El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene®Q o SmartCycler®.

ANEXO 2:

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MAS 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	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/60	
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	
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	

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

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene®Q and SmartCycler®. 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).

---

VIASURE *Zika, Dengue & Chikungunya* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, Rotor-Gene®Q y SmartCycler®. 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).

- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ is 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.





CERTEST BIOTEC S.L.  
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

[www.certest.es](http://www.certest.es) 