

REAL TIME PCR DETECTION KIT

West Nile Virus

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

VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-WNV106L
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-WNV106H
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-WNV112L
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-WNV112H
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-WNV113L
VIASURE <i>West Nile Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-WNV113H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for specific identification of West Nile virus in clinical samples from patients with signs and symptoms of West Nile virus infection. This test is intended for use as an aid in the diagnosis of the West Nile virus in combination with clinical and epidemiological risk factors. RNA is extracted from specimens, amplified using RT-PCR and detected using fluorescent reporter dye probes specific for West Nile virus.

2. Summary and Explanation

Since its initial isolation in Uganda in 1937 through the present, West Nile virus (WNV) has propagated to a vast region of the globe and is now considered the most important causative zoonotic pathogen of viral encephalitis worldwide. WNV belongs to the genus *Flavivirus* and is a member of the Japanese encephalitis serogroup. Phylogenetic analysis has revealed two main lineages of WNV, lineage 1, which is widely distributed and further subdivided in three clades (A, B and C) and lineage 2. While several additional lineages have been proposed during the last years.

In nature, there is an enzootic transmission cycle of WNV between birds (hosts) and mosquitoes (bridge vectors) of the genus *Culex* (mainly *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* and *Cx. modestus*) and *Aedes*. But this virus can infect other vertebrates and humans, between which it has been reported additional methods of transmission: blood transfusion, organ transplantation, transplacental transmission, and via breastmilk. Most human infections with WNV (~80%) are asymptomatic or characterized by a mild-febrile syndrome and flu-like malaise. Nevertheless, fewer than 1% infection may progress to more severe neuroinvasive disease (WNND) and even death, depending on the host immune response and the viral strain. WNND usually encompasses three different syndromes: encephalitis, meningitis, and acute flaccid paralysis.

WNV has a single stranded positive-polarity RNA genome which encodes a single polyprotein that is co- and posttranslationally cleaved into 3 structural proteins and 7 nonstructural proteins. Laboratory diagnosis is generally accomplished by testing of serum or cerebrospinal fluid (CSF) to detect WNV-specific IgM antibodies and confirmed by plaque-reduction neutralization tests (PRNTs). However, the cross-reactivity with infections caused by other flaviviruses remains the major problem with most serological diagnostic tests. In this regard, different PCR-based protocols have been developed to detect viral RNA and can be performed on serum and CSF, both collected early in the course of illness, and additional tissue specimens as urine, where it can be detected much longer and at higher concentrations.

3. Principle of the procedure

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the West Nile virus in clinical samples. The detection is done in one step real time RT format where the reverse transcription and the subsequent amplification of specific target sequence occur in the same reaction well. The isolated RNA target is

transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved sequence of genomic region 5'UTR using specific primers and a fluorescent-labeled probe.

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

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

4. Reagents provided

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table 1 and Table 2:

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-WNV1SL/ VS-WNV1SH	<i>West Nile 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-WNV1C	<i>West Nile 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 *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-WNV106L, VS-WNV106H, VS-WNV112L and VS-WNV112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Color	Amount
VS-WNV1PL/ VS-WNV1PH	<i>West Nile 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-WNV1C	<i>West Nile 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 *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-WNV113L and VS-WNV113H.

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 *West Nile Virus* 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 μ L, 20-200 μ 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 (serum, CSF, urine, and others) you can use your manually or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions for use. We have validated the following extraction kits:

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

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

West Nile 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 *West Nile 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 aluminum 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 *West Nile 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 FAM (West Nile virus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none.

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 West Nile Virus 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:

West Nile Virus	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	West Nile Virus Positive
-	+	-	+	West Nile Virus Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

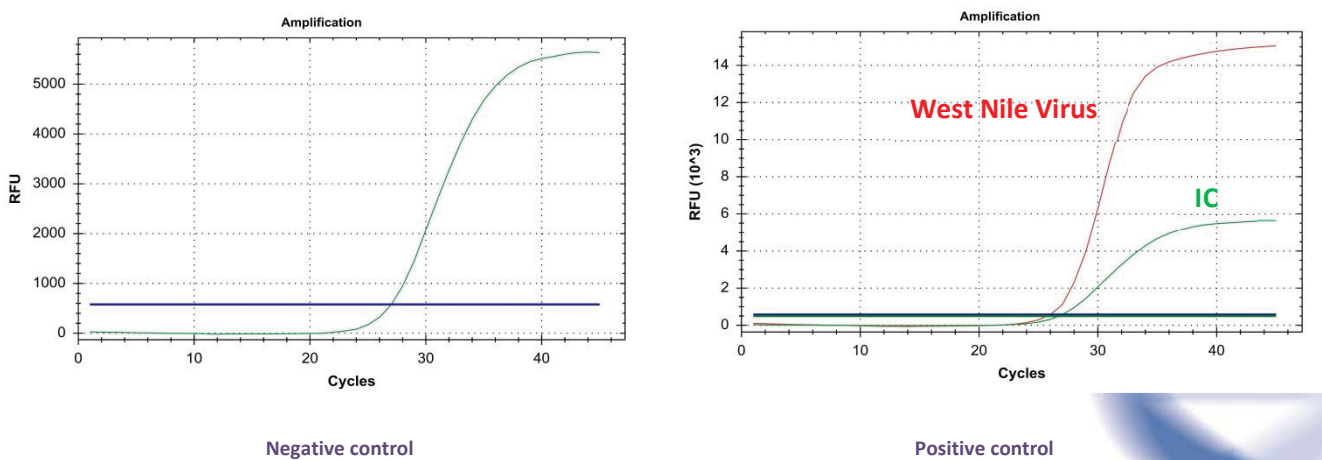
Table 4. Sample interpretation

- +: 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 West Nile virus, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

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

12. Performance characteristics

12.1. CLINICAL SENSITIVITY AND SPECIFICITY

The clinical performance of VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit was tested using 17 serum samples from symptomatic patients. The results were compared with those obtained by commercial Real Time RT-PCR kit (RealStar® WNV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)). None of 17 samples were positive for West Nile Virus by Real Time PCR assays.

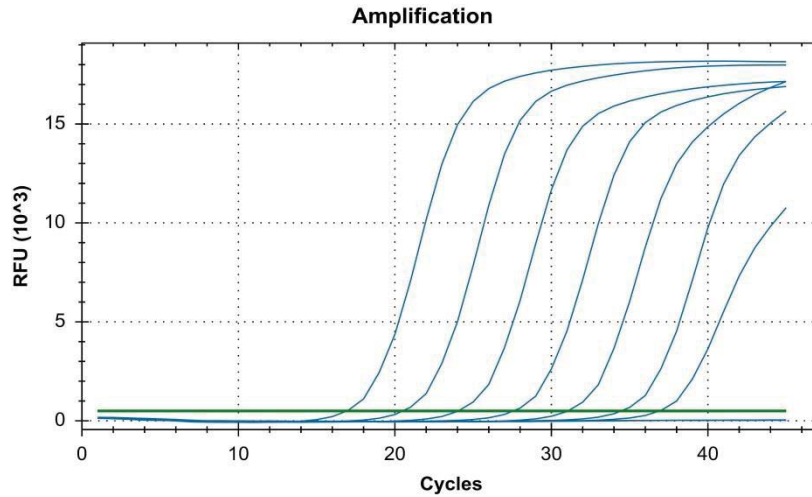
VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated with QCMD 2014 and 2016 panels from West Nile Virus RNA EQA Programme. Panel from 2014 consists of 12 clinical specimens dissolved in transport medium. The results were compared with those obtained by a commercial Real Time PCR Kit (RealStar® WNV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)) and West Nile Virus 2014 RNA EQA Programme final report. All samples which contained different dilutions of West Nile Virus strains NY99 (lineage 1), Ug37 and Heja (lineage 2) could be detected. In addition, WNV Negative and Non-WNV flaviviruses samples (which include Japanese Encephalitis virus/Dengue virus types 1-4/ Tick borne Encephalitis virus/ Yellow Fever virus) could be confirmed as a negative. Panel from 2016 consists of 10 clinical specimens. All WNV samples could be detected, and WNV Negative and Non- WNV flaviviruses specimens could be confirmed as a negative as well.

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

12.2. ANALYTICAL SENSITIVITY

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

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



12.3. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the West Nile virus assay was confirmed by testing a panel consisting of 8 microorganisms representing the most common arbovirus. No cross-reactivity was detected against any of the following microorganisms tested.

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

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.4. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against West Nile virus H160/99, Heja and Ug37 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™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ 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	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
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
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
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ 2 Real-Time PCR Detection System
Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex
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® tubes.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

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

2. Introducción y explicación

Desde que se aislara inicialmente en Uganda en 1937 hasta ahora, el virus del Nilo occidental (West Nile Virus, WNV) se ha propagado a una vasta región del mundo y hoy en día se considera el patógeno zoonótico causal más importante de encefalitis viral en todo el mundo. WNV pertenece al género *Flavivirus* y al serocomplejo de la encefalitis japonesa. El análisis filogenético ha revelado dos principales linajes de virus del Nilo Occidental, el linaje 1, ampliamente distribuido, el cual se subdivide en tres subtipos (A, B y C) y el linaje 2. Si bien, durante los últimos años se han sugerido varios linajes adicionales.

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

El Virus del Nilo Occidental tiene un genoma de RNA de sentido positivo que codifica una sola poliproteína que es co- y post-traduccionalmente escindida en 3 proteínas estructurales y en 7 no estructurales. El diagnóstico de laboratorio se realiza generalmente mediante pruebas serológicas a partir de suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) para detectar anticuerpos IgM específicos de WNV y se confirma mediante pruebas de neutralización por reducción de placas (PRNTs). Sin embargo, la reactividad cruzada con las infecciones causadas por otros flavivirus sigue siendo el principal problema de los test de diagnóstico serológicos. A este respecto, diferentes protocolos basados en PCR se han desarrollado para detectar el RNA viral. Para realizar estas pruebas podemos partir de muestras de suero y LCR, recogidas durante el curso temprano de la enfermedad, así como muestras de tejidos adicionales como la orina, donde se puede detectar durante mucho más tiempo y en concentraciones más altas.

3. Procedimiento

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico del virus West Nile en muestras clínicas. La detección se realiza a través de la retrotranscripción en un solo paso y posterior amplificación a tiempo real de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. Tras el aislamiento del RNA, se sintetiza el DNA complementario a la secuencia diana gracias a la retrotranscriptasa o transcriptasa inversa. Posteriormente la identificación del virus West Nile se lleva a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan con una secuencia conservada de la región genómica 5'UTR.

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la DNA-polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*.

Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de RNA diana. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPS, tampón, polimerasa, retrotranscriptasa) polimerasa) en formato estabilizado, así como, un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa. Tras la reacción de amplificación el virus West Nile se detecta en el canal FAM y el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *West Nile Virus* 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-WNV1SL/ VS-WNV1SH	<i>West Nile 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-CHI1C	<i>West Nile 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 *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-WNV106L, VS-WNV106H, VS-WNV112L, VS-WNV112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-WNV1PL/ VS-WNV1PH	West Nile Virus 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-WNV1C	West Nile Virus 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 West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-WNV113L y VS-WNV113H.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE West Nile Virus Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador) (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

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- 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 (suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, y otras), puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar cualquier kit de extracción de RNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado Maxwell® 16 instrument (Promega).
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, utilizando el sistema de extracción automatizado QIAcube instrument (Qiagen).

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

El vial de *West Nile Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *West Nile Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

8.3. 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 *West Nile 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 FAM (virus West Nile) y HEX, JOE o VIC (Control Interno). 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.

9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de virus West Nile. Comprobar la emisión de la señal del control 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:

Virus West Nile	Control interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Virus West Nile Positivo
-	+	-	+	Virus West Nile Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

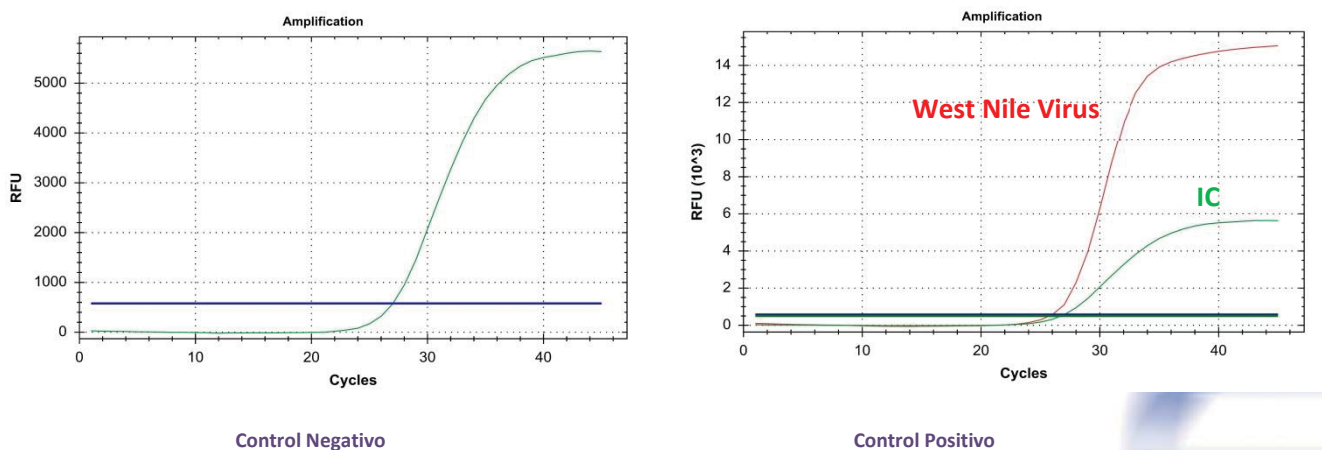
Tabla 4. Interpretación

+: 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 virus West Nile, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de RNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

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

12. Características del test

12.1. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD CLINICA

El test VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit fue evaluado con 17 muestras de suero de pacientes sintomáticos. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RealStar® WNV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)). Ninguna de las 17 muestras analizadas resultó positiva para el virus West Nile mediante los ensayos de PCR a Tiempo Real.

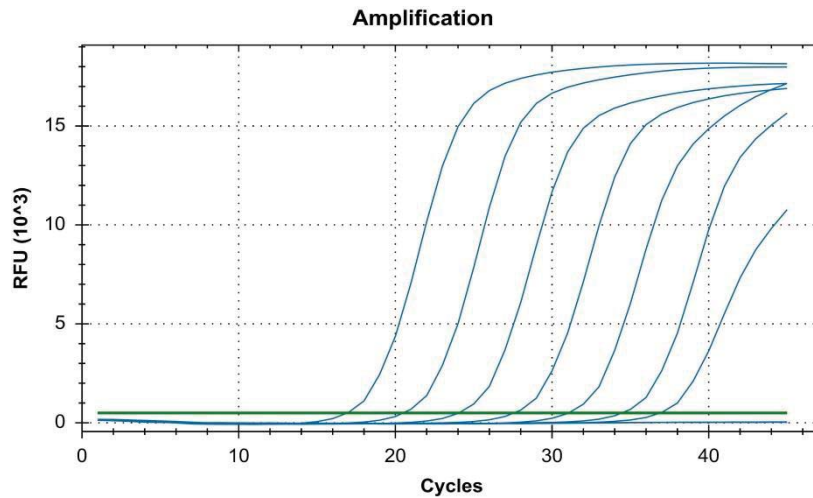
VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó con el panel de muestras que la organización QCMD dispuso en los años 2014 y 2016 para la evaluación del virus West Nile como parte del programa de Evaluación Externa de la calidad (EEC). El panel del año 2014 se compone de 12 muestras clínicas disueltas en un medio de transporte. Los resultados se compararon con los obtenidos por un kit de PCR a tiempo real comercial (RealStar® WNV RT-PCR Kit (Altona Diagnostics)) y el informe final del programa EEC para la detección de Virus West Nile en el año 2014. Todas las muestras que contenían diluciones de las cepas del virus West Nile NY99 (linaje 1), Ug37 y Heja (linaje 2) pudieron ser detectadas. En cambio, tanto la muestra West Nile negativa como la West Nile negativa pero positiva para otros flavivirus (Virus de la Encefalitis Japonesa, Virus Dengue serotipos 1-4, Encefalitis transmitida por garrapatas, Virus de la Fiebre Amarilla) pudieron ser confirmadas como negativas. El a panel del año 2016 se compone de 10 muestras. Todas las muestras WNV positivas pudieron ser detectadas y también los especímenes negativos pudieron ser confirmados como negativos.

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

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

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

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



12.3. ESPECIFICIDAD ANALITICA

La especificidad del ensayo del virus West Nile fue confirmada probando un panel compuesto por 8 microorganismos que representan los arbovirus más comunes. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

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

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

12.4. REACTIVIDAD ANALITICA










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

13. Bibliography/Bibliografía

1. C. Chancey et al. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed Research International* 2015; 2015:376230.
2. A. Rizzoli et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance* 2015; 20(20): 21135.
3. S. Linke et al. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 2007; 146(1-2): 355-358.
4. Centers for Disease Control and Prevention. West Nile Virus (<https://www.cdc.gov/westnile/>).

5. World Health Organization. Zika virus and potential complications (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/en/>).

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	 LOT	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	 REF	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™ 3 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne Plus™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	StepOne™ Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	Mini Opticon™ 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®*

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700
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
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
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™2 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®*

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®.

VIASURE *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System and DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler. 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 *West Nile Virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System y DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler. 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™, 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.



CERTEST BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, N° 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)

www.certest.es

