

REAL TIME PCR DETECTION KIT

Yellow Fever

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

VIASURE <i>Yellow Fever</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-FEV106L
VIASURE <i>Yellow Fever</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-FEV106H
VIASURE <i>Yellow Fever</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-FEV112L
VIASURE <i>Yellow Fever</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-FEV112H
VIASURE <i>Yellow Fever</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile	VS-FEV113L
VIASURE <i>Yellow Fever</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile	VS-FEV113H

VIASURE



ENGLISH

1. Intended of use

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

2. Summary and Explanation

Yellow fever virus is an RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family. The "yellow" in the name refers to the jaundice caused by liver involvement that affects some patients.

Yellow fever is an acute viral haemorrhagic zoonotic disease transmitted between humans and from monkeys to humans by mosquitoes, primarily by *Aedes (aegypti)* and *Haemogogus*, in 1 of 3 cycles: urban yellow fever, jungle (sylvatic) yellow fever, and intermediate (savannah) yellow fever. More than 900 million inhabitants and travellers are at risk in the 44 endemic countries of Latin America and Africa.

The incubation period is generally 3–6 days from infection until illness. Many people do not experience symptoms, but when these do occur, the most common are an acute febrile phase occurs with myalgia, headache, back pain, anorexia, nausea, and sometimes vomiting; symptoms typically resolve within 1 week. Small proportions of patients enter a second, more toxic phase within 24 hours of recovering from initial symptoms, and develop severe symptoms (with high fever, jaundice, bleeding, and kidney damage). Half of the patients who enter this toxic phase die; due to there is currently no specific anti-viral drug. Although, specific care to treat dehydration, liver and kidney failure, and fever improves outcomes. Therefore, vaccination and mosquito control are the most important means of preventing yellow fever.

Yellow fever is difficult to diagnose, especially during the early stages. It can be confused with severe malaria, leptospirosis, viral hepatitis (especially the fulminating forms of hepatitis B and D), other hemorrhagic fevers, infection with other flaviviruses (Dengue, Zika and West Nile viruses), and poisoning. Usually, the detection of yellow fever virus is carried out by virus cultivation on susceptible cells followed by immunofluorescence, ELISA, immunohistochemical examination or PCR. For quantifying the load of infectious particles in cell culture or serum samples, plaque assay is still the commonly used method. However, this is cumbersome and time-consuming technique. With the recent development of Real-Time PCR, a rapid and accurate alternative to quantify viral load in blood is available.

3. Principle of the procedure

VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of the Yellow fever 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 *ribonucleoprotein* gene using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Yellow Fever* 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 *Yellow Fever* 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. Yellow fever 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 *Yellow Fever* 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-FEV1SL/ VS-FEV1SH	<i>Yellow fever</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-FEV1C	<i>Yellow fever</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 *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-FEV106L, VS-FEV106H, VS-FEV112L and VS-FEV112H.

Reference	Reagent/Material	Description	Colour	Amount
VS-FEV1PL/ VS-FEV1PH	<i>Yellow fever</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-FEV1C	<i>Yellow fever</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 *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-FEV113L and VS-FEV113H.

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 *Yellow Fever* 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 blood samples 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.

8.2. LYOPHILIZED POSITIVE CONTROL

Yellow fever 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 *Yellow fever* 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 *Yellow fever* 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 (*Yellow fever*) 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 *Yellow fever* 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 analyse the results:

Yellow fever	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+/-	-	+	Yellow fever Positive
-	+	-	+	Yellow fever Negative
+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	Experiment fail

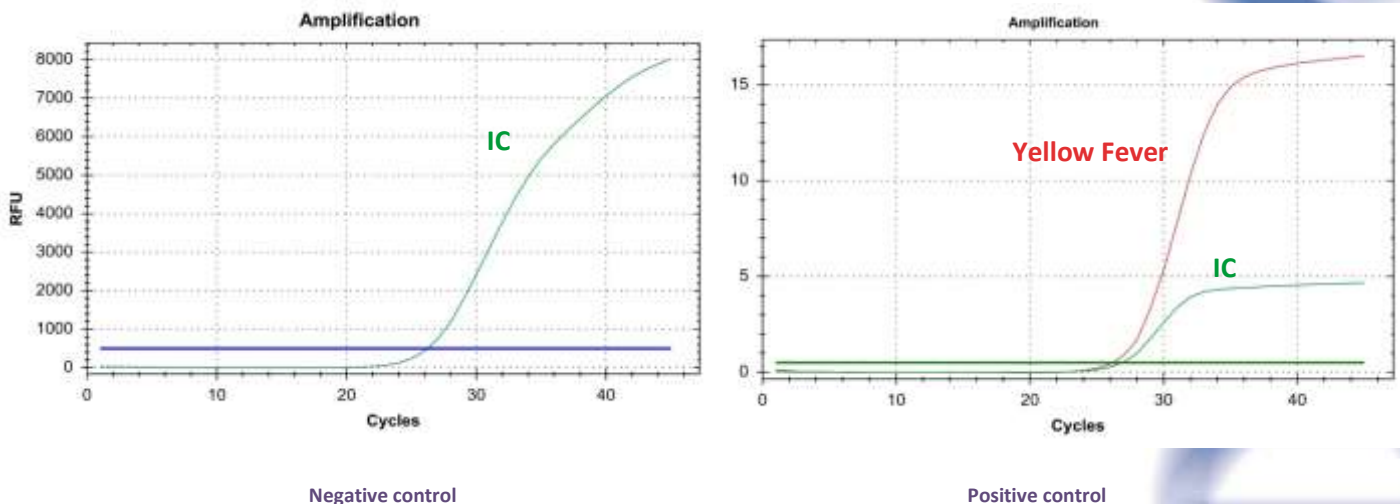
Table 4. Sample interpretation

- +: 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 blood 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 Yellow fever, either samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

11. Quality control

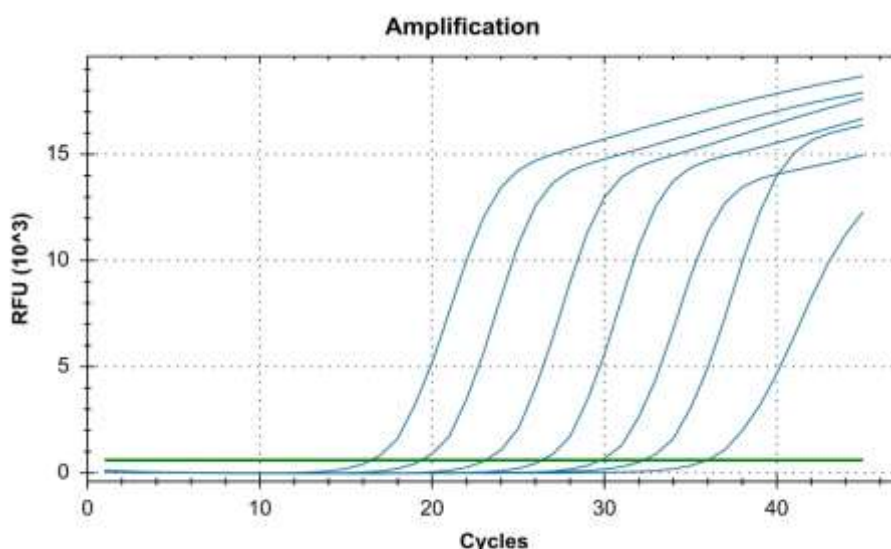
VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. ANALYTICAL SENSITIVITY

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

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



12.2. ANALYTICAL SPECIFICITY

The specificity of the Yellow fever assay was confirmed by testing a panel consisting of 25 microorganisms representing the most common flavivirus, bloodstream pathogens or that cause acute febrile illness.

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

Cross-reactivity testing			
Chikungunya virus strain S27 Petersfield	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
Dengue 1 virus strain Hawaii	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Dengue 2 virus strain New Guinea C	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Dengue 3 virus strain H87	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Dengue 4 virus strain H241	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	-
St Louis Encephalitis virus strain 17D	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
West Nile virus strain H160/99	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
West Nile virus Heja	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
West Nile virus Ug37	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	-	<i>Bartonella henselae</i>	-
<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	-	<i>Coxiella burnetii</i>	-
<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i>	-
<i>Salmonella enterica subsp. entérica</i>	-	Zika virus strain MR 766	-

Table 6. Reference pathogenic microorganisms used in this study.

12.3. ANALYTICAL REACTIVITY

The reactivity of VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against Yellow Fever virus strain 17D 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 Cyclers
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 Cyclers
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 and SmartCycler® tubes.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación específica de la fiebre amarilla en muestras clínicas procedentes de pacientes con signos y síntomas de infección por fiebre amarilla. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por la fiebre amarilla 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 fiebre amarilla.

2. Introducción y explicación

El virus de la fiebre amarilla es un virus de RNA perteneciente a la familia *Flaviviridae*. El término "amarillo" del nombre de este virus hace referencia a la ictericia que presentan algunos pacientes debido a la afección hepática.

La fiebre amarilla es una enfermedad zoonótica hemorrágica viral aguda que se transmite entre humanos y monos a humanos a través de los mosquitos, principalmente por *Aedes (aegypti)* y *Haemogogus*. Existen tres tipos de ciclos de transmisión: fiebre amarilla urbana, fiebre amarilla selvática (silvestre) y fiebre amarilla intermedia (sabana). Más de 900 millones de habitantes y viajeros están en riesgo en los 44 países endémicos de América Latina y África.

El período de incubación es generalmente de 3 a 6 días desde la infección hasta el desarrollo de la enfermedad. Muchas personas no experimentan síntomas, pero cuando estos ocurren, los más comunes son una fase febril aguda con mialgia, dolor de cabeza, dolor de espalda, anorexia, náuseas y a veces vómitos; síntomas que suelen resolverse dentro de una semana. Un porcentaje bajo de pacientes entran en una segunda fase más tóxica a las 24 horas de la remisión inicial y desarrollan síntomas severos (con fiebre alta, ictericia, sangrado y daño renal). La mitad de los pacientes que entran en esta fase tóxica mueren; debido a que actualmente no hay ningún tratamiento antiviral específico, pero el desenlace mejora con el tratamiento de la deshidratación, la insuficiencia hepática y renal y la fiebre. Por lo tanto, la vacunación y el control de mosquitos son los medios más importantes para prevenir la fiebre amarilla.

La fiebre amarilla es difícil de diagnosticar, especialmente durante las primeras etapas. Se puede confundir con malaria severa, leptospirosis, hepatitis viral (especialmente las formas fulminantes de la hepatitis B y D), otras fiebres hemorrágicas, infección con otros flavivirus (virus del Dengue, Zika y del Nilo Occidental) y envenenamiento. Por lo general, la detección del virus de la fiebre amarilla se lleva a cabo mediante cultivo de virus en células susceptibles, seguida de inmunofluorescencia, ELISA, estudio inmunohistoquímico o PCR. Para cuantificar la carga de partículas infecciosas en cultivo celular o muestras de suero, el ensayo de placa sigue siendo el método comúnmente utilizado. Sin embargo, esta técnica es incómoda y requiere mucho tiempo. Con

el reciente desarrollo de la PCR a tiempo real, existe una alternativa rápida y precisa para cuantificar la carga viral en la sangre.

3. Procedimiento

VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico de la fiebre amarilla 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 la fiebre amarilla 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 *ribonucleoproteína*.

VIASURE *Yellow Fever* 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 *Yellow Fever* 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, la fiebre amarilla 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 *Yellow Fever* 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-FEV1SL/ VS-FEV1SH	<i>Yellow fever</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-FEV1C	<i>Yellow fever</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 RNAse/DNAse	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 *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-FEV106L, VS-FEV106H, VS-FEV112L, VS-FEV112H.

Referencia	Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
VS-FEV1PL/ VS-FEV1PH	<i>Yellow fever</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-FEV1C	<i>Yellow fever</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 *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-FEV113L y VS-FEV113H.

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 *Yellow Fever* 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 sangre, 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.

8.2. CONTROL POSITIVO LIOFILIZADO

El vial de *Yellow fever* 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 *Yellow fever* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 μ L 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 μ L del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 μ L de RNA extraído de cada muestra, de *Yellow fever* 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 (fiebre amarilla) 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 fiebre amarilla. 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:

Fiebre amarilla	Control interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Fiebre amarilla Positivo
-	+	-	+	Fiebre amarilla Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

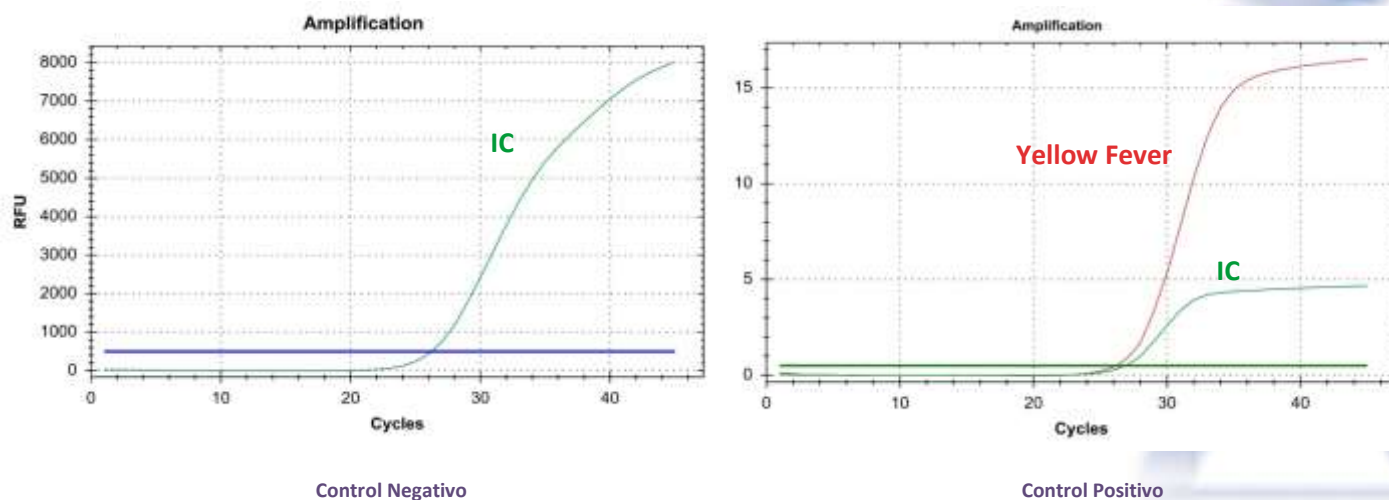
Tabla 4. Interpretación

+: 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 sangre.
- 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 fiebre amarilla, 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

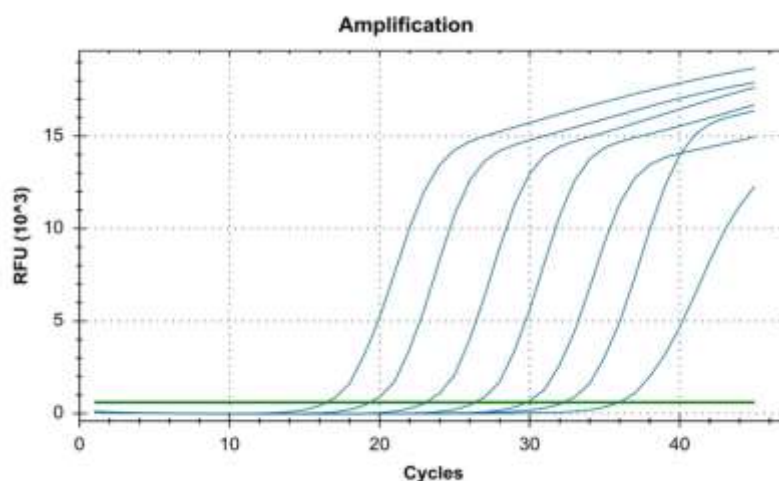
VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.2. SENSIBILIDAD ANALITICA

VIASURE *Yellow Fever* 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 fiebre amarilla (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 de la fiebre amarilla fue confirmada probando un panel compuesto por 25 microorganismos que representan los flavivirus más comunes, patógenos presentes en el torrente sanguíneo o que causan síndrome febril agudo. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Prueba de reacción cruzada			
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	-	<i>Salmonella typhi</i>	-
Virus Dengue 1 cepa Hawaii	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea C	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Virus Dengue 3 cepa H87	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Virus Dengue 4 cepa H241	-	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	-
Virus de la encefalitis de San Luis cepa 17D	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus West Nile cepa H160/99	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Virus West Nile Heja	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-
Virus West Nile Ug37	-	<i>Haemophilus influenzae</i>	-
<i>Plasmodium falciparum</i>	-	<i>Bartonella henselae</i>	-
<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	-	<i>Coxiella burnetii</i>	-
<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	-	<i>Rickettsia conorii</i>	-
<i>Salmonella enterica subsp. entérica</i>	-	Virus Zika cepa MR 766	-

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











12.4. REACTIVIDAD ANALITICA

La reactividad de VIASURE *Yellow Fever* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a la cepa de fiebre amarilla 17D, mostrando un resultado positivo.

13. Bibliography/Bibliografía

1. 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.
2. A.G. Fernandes-Monteiro et al. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2015; 11(7): 1865-1871.
3. World Health Organization. Yellow fever. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
4. World Health Organization. Emergencies preparedness, response. Yellow fever. <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/en>
5. Centers for Disease Control and Prevention. Yellow fever. <https://www.cdc.gov/yellowfever/>

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®Q*
Cepheid	SmartCycler®*

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 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®*

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®.

VIASURE *Yellow Fever* 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, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and SmartCycler® (Cepheid). When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommended to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506).

VIASURE *Yellow Fever* 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, DNA-Technology DTprime Real-time, Rotor-Gene® Q (Qiagen) y SmartCycler® (Cepheid). Detection Thermal Cyclers. 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.
- 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

