

Vitassay qPCR

Viral Meningitis

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación de los virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y virus varicela zóster en muestras humanas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of herpes simplex virus 1, herpes simplex virus 2 and/or varicella zoster virus in human samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR Viral Meningitis, permite la detección y diferenciación del virus del herpes simple 1 (HSV-1), virus del herpes simple 2 (HSV-2) y/o virus varicela zóster (VZV) mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y/o virus varicela zóster.

Referencias

Vitassay qPCR Viral Meningitis 4x8-well strip, low profile 7041045

Vitassay qPCR Viral Meningitis 4x8-well strip, high profile 7042045

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S045/ 7042S045	Viral Meningitis strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C045	Viral Meningitis Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	4 tiras de 8 tapones

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1.5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Resumen

HSV-1, HSV-2 y VZV son infecciones altamente contagiosas que son comunes y endémicas en todo el mundo. Estos patógenos son virus de ADN de doble cadena que pertenecen a la familia *Herpesviridae*. La mayoría de las infecciones por HSV-1 se adquieren durante la infancia y la infección dura toda la vida. La gran mayoría de las infecciones por HSV-1 son herpes oral, pero una proporción de las infecciones por HSV-1 son herpes genital. Los síntomas del herpes oral incluyen ampollas dolorosas o llagas abiertas en o alrededor de la boca. El HSV-1 se transmite principalmente por contacto oral a oral para causar una infección por herpes oral, a través del contacto con el virus HSV-1 en llagas, saliva y superficies en o alrededor de la boca. Sin embargo, el HSV-1 también puede transmitirse al área genital a través del contacto oral-genital para causar herpes genital. Estos pueden ser asintomáticos o pueden tener síntomas leves que no se reconocen. Cuando ocurren los síntomas, el herpes genital se caracteriza por una o más ampollas o úlceras genitales o anales.

Las personas que ya tienen una infección por HSV-1 no corren el riesgo de contraerla nuevamente, pero aún corren el riesgo de contraer la infección genital del virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2). Este virus es casi exclusivamente de transmisión sexual, causando herpes genital. La infección también es de por vida e incurable. Más mujeres están infectadas con HSV-2 que los hombres; esto se debe a que la transmisión sexual de este patógeno es más eficiente de hombres a mujeres que de mujeres a hombres. Las infecciones por herpes genital a menudo no tienen síntomas, o síntomas leves que no se reconocen. Por lo general, alrededor del 10-20% de las personas con infección por HSV-2 reportan un diagnóstico previo de herpes genital. Cuando ocurren los síntomas, el herpes genital se caracteriza por una o más ampollas genitales o anales o llagas abiertas. Además de las úlceras genitales, los síntomas de las nuevas infecciones por herpes genital a menudo incluyen fiebre, dolores corporales e inflamación de los ganglios linfáticos. El HSV-2 se transmite principalmente durante las relaciones sexuales, a través del contacto con las superficies genitales, la piel, las llagas o los fluidos de alguien infectado con el virus.

En raras circunstancias, las infecciones por HSV-1 o HSV-2 pueden transmitirse de una madre a su bebé durante el parto.

El virus de la varicela zoster causa tanto la varicela (varicela) como el herpes zoster (HZ). El VZV produce una erupción vesicular generalizada en la dermis en niños normales, generalmente antes de los 10 años de edad. Después de la infección primaria, el virus persiste en forma latente y puede aparecer como herpes zoster (culebrilla). La varicela es altamente contagiosa. El virus se puede propagar de persona a persona por contacto directo, inhalación de aerosoles del líquido vesicular de las lesiones cutáneas de varicela aguda o zoster. Una persona con varicela es contagiosa entre 1 y 2 días antes de la aparición de la erupción hasta que las lesiones tienen

costras. La varicela a menudo se diagnostica clínicamente sobre la base de una erupción maculopapulovesicular generalizada. Para confirmación de laboratorio, las lesiones cutáneas son el espécimen preferido. Se pueden usar frotis vesiculares o raspados y costras de lesiones costrosas para identificar el ADN del virus de la varicela-zoster mediante PCR.

Los ensayos de PCR en tiempo real han demostrado ser una herramienta para la detección del virus del herpes simple tipos 1 y 2 y el virus Varicella-zoster para acortar el tiempo de detección y mejorar la sensibilidad.

Principio del test

Vitassay qPCR Viral Meningitis se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de los genes *US4* y *US6* para el virus del herpes simple 1 y el virus del herpes simple 2 respectivamente y *ORF29* para el virus varicela zóster. Tras la extracción de DNA, la presencia de virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y/o virus varicela zóster se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR Viral Meningitis, se trata de un test *listo para usar* que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. La amplificación de la secuencia diana es detectada en el canal Cy5 (Virus varicela zóster), ROX (Virus del herpes simple 2) y FAM (Virus del herpes simple 1) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado).

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior.

- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA.

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).

NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec).

MagDEA Dx SV kit, utilizando el magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

NX-48 Urine/Swab DNA Kit utilizando el Nextractor® NX-48 system, (Genolution).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del Viral Meningitis Positive Control (tubo rojo) con 100 µL de agua ultrapura (PCR grade wáter, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) y Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (Virus del herpes simple 1), Cy5 (Virus varicela zóster), ROX (Virus del herpes simple 2) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, y Stratagene Mx3005P™ comprobar que la opción del control pasivo ROX esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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.

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación en los canales de Virus del herpes simple 1 (FAM), Virus del herpes simple 2 (ROX) y virus varicela zóster (Cy5).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de Cy5, ROX y FAM.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. El ensayo se debe de repetir.

Con la ayuda de la siguiente tabla, analizar los resultados:

Virus del herpes simple 1 (FAM)	Virus del herpes simple 2 (ROX)	Virus varicela zóster (Cy5)	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+	+/-	-	+	Virus Herpes simple 1, Virus Herpes simple 2 y virus varicela zóster Positivos
-	-	-	+	-	+	Virus Herpes simple 1, Virus Herpes simple 2 y virus varicela zóster Negativos
+	-	-	+/-	-	+	Virus Herpes simple 1 Positivo, Virus Herpes simple 2 y virus varicela zoster Negativoó
+	+	-	+/-	-	+	Virus Herpes simple 1 y Virus Herpes simple 2 Positivos, y virus varicela zóster Negativo.
+	-	+	+/-	-	+	Virus Herpes simple 1 y virus varicela zóster Positivos, y Virus Herpes simple 2 Negativo
-	+	-	+/-	-	+	Virus Herpes simple 2 Positivo, Virus Herpes simple 1 y virus varicela zóster Negativos.
-	+	+	+/-	-	+	Virus Herpes simple 2 y virus varicela zóster Positivos, Virus Herpes simple 1 Negativo
-	-	+	+/-	-	+	Virus varicela zóster Positivo, Virus Herpes simple 1 y Virus Herpes simple 2 Negativos
+	+	+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los parásitos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

Vitassay qPCR Viral Meningitis se evaluó mediante paneles de QCMD y paneles de INSTAND. Estos paneles constan de 91 muestras clínicas (muestras en medio de transporte, hisopos, orina y sangre). Los resultados se compararon con los informes finales de los programas de QCMD e INSTAND. 17 de las 91 muestras de los paneles fueron positivas para el virus del herpes simple 1, 16 de las 91 fueron positivas para el virus del herpes simple 2 y 25 de las 91 muestras fueron positivas para el virus varicela zóster utilizando Vitassay qPCR Viral Meningitis.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar los virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y/o virus varicela zóster, utilizando Vitassay qPCR Viral Meningitis.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes parásitos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA por reacción para el virus herpes simple tipo 2 y virus varicela zóster y un límite de detección de ≥ 50 copias de DNA por reacción para el virus del herpes simple tipo 1.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y el virus varicela zóster fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos.

No se observaron reacciones cruzadas de virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y virus varicela zóster entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad cruzada

<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i>	Coxsackievirus type B3
<i>Listeria innocua</i> Serotype 6a/strain CCUG 15531	<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	Parechovirus Type 3
<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/strain CCUG 15528	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	Parvovirus B19
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	St Louis Encephalitis Virus strain 17D
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Strain CIP 59.53	<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Chikungunya virus (S27 Petersfield)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	Dengue 1 (Hawaii A strain)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	<i>Treponema pallidum</i>	Dengue 2 (New Guinea C strain)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	Dengue 3 (H87)
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotype Cloaca A	Enterovirus type 68	Dengue 4 (H241)
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotype Cloaca B	Enterovirus type 71	West Nile Virus (Heja)
<i>Enterococcus durans</i>	Epstein-Barr virus	West Nile Virus (NY99)
<i>Enterococcus faecalis</i>	BK Virus Type Ib2	West Nile Virus (Ug37)
<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	BK Virus Type IV	Yellow Fever Virus (17D strain)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	JC Virus Type 2B	Echovirus Type 30
<i>Candida albicans</i>	JC Virus Type 1A	Echovirus Type 11
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Citomegalovirus strain AD-169	HHV6 strain Z29
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1	Coxsackievirus type A24	HHV6 Type A
<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	Coxsackievirus type A9	HHV6 Type B

Reactividad analítica

Vitassay qPCR Viral Meningitis para Virus Herpes 1 ha sido evaluado frente la cepa HSV 1 MacIntyre y cepas HSV-1 (95/1906) obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Viral Meningitis para Virus Herpes 2 ha sido evaluado frente a la cepa HSV 2 MS, obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Vitassay qPCR Viral Meningitis para virus varicela zoster ha sido evaluado frente a Virus Varicella-Zoster Ellen, Virus Varicella Zoster OKA y Varicella Zoster virus cepas (9/84), obteniéndose un resultado positivo para todas ellas.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR Viral Meningitis, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por el virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2 y virus varicela zóster. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido probado en muestras en medio de transporte, hisopos urogenitales, sangre, orina LCR y células epiteliales de las lesiones o costras de la varicela. El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas humanas. 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 del DNA 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 diferentes patógenos, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

Adjunto I: Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil
Agilent Technologies
AriaMx Real-Time PCR System
Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
StepOne Plus™ Real-Time PCR System
StepOne™ Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Real-Time PCR Detection System
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Roche
LightCycler®480 Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System
Cobas z480 Analyzer

Termocicladores con bloque de alto perfil
Abbott
Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems
7300 Real-Time PCR System
7500 Real-Time PCR System
7900 HT Real-Time PCR System
ABI PRISM 7000
ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 6 Flex 96-well
QuantStudio™ 7 Flex 96-well
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
ViiA™ 7 Real-Time PCR
Analytik Jena Biometra
TOptical
qTOWER 2.0
BIONEER
Exicycler™ 96
Bio-Rad
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
iCycler iQ™ Real-Time PCR
iCycler iQ™5 Real-Time PCR
MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cepheid
SmartCycler®
DNA-Technology
DTlite Real-Time PCR System*
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
Eppendorf
Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen
Rotor-Gene® Q
Stratagene / Agilent Technologies
Mx3000P™ Real Time PCR System
Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	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	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR Viral Meningitis allows the detection and differentiation of herpes simplex virus 1 (HSV-1), herpes simplex virus 2 (HSV-2) and/or varicella zoster virus (VZV) by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of herpes simplex virus 1, herpes simplex virus 2 and/or varicella zoster virus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR Viral Meningitis 4x8-well strip, low profile	7041045
Vitassay qPCR Viral Meningitis 4x8-well strip, high profile	7042045

Materials/reagents provided

Code	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S045/ 7042S045	Viral Meningitis strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C045	Viral Meningitis Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yelow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	4x8 cap strip

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated in the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. In order to avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

HSV-1, HSV-2 and VZV are highly contagious infections which are common and endemic throughout the world. These pathogens are double-stranded DNA viruses belonging to *Herpesviridae* family. Most HSV-1 infections are acquired during childhood, and infection is lifelong. The vast majority of HSV-1 infections are oral herpes but a proportion of HSV-1 infections are genital herpes. Symptoms of oral herpes include painful blisters or open sores in or around the mouth. HSV-1 is mainly transmitted by oral-to-oral contact to cause oral herpes infection, via contact with the HSV-1 virus in sores, saliva, and surfaces in or around the mouth. However, HSV-1 can also be transmitted to the genital area through oral-genital contact to cause genital herpes. These can be asymptomatic or can have mild symptoms that go unrecognized. When symptoms do occur, genital herpes is characterised by one or more genital or anal blisters or ulcers.

People who already have HSV-1 infection are not at risk of getting it again, but they are still at risk of acquiring herpes simplex virus type 2 (HSV-2) genital infection. This virus is almost exclusively sexually transmitted, causing genital herpes. The infection is also lifelong and incurable. More women are infected with HSV-2 than men; this is because sexual transmission of this pathogen is more efficient from men to women than from women to men. Genital herpes infections often have no symptoms, or mild symptoms that go unrecognized. Typically, about 10-20% of people with HSV-2 infection report a prior diagnosis of genital herpes. When symptoms do occur, genital herpes is characterised by one or more genital or anal blisters or open sores. In addition to genital ulcers, symptoms of new genital herpes infections often include fever, body aches, and swollen lymph nodes. HSV-2 is mainly transmitted during sex, through contact with genital surfaces, skin, sores or fluids of someone infected with the virus.

In rare circumstances, HSV-1 or HSV-2 infections can be transmitted from a mother to her infant during delivery.

Varicella-zoster virus causes both varicella (chickenpox) and herpes zoster (HZ). VZV produces a generalized vesicular rash on the dermis in normal children, usually before 10 years of age. After primary infection, the virus persists in latent form and may emerge as herpes zoster (shingles). Varicella is highly contagious. The virus can be spread from person to person by direct contact, inhalation of aerosols from vesicular fluid of skin lesions of acute varicella or zoster. A person with varicella is contagious from 1-2 days before rash onset until the lesions have crusted. Varicella is often diagnosed clinically on the basis of a generalized maculopapulovesicular rash. For laboratory confirmation, skin lesions are the preferred specimen. Vesicular swabs or scrapings and scabs from crusted lesions can be used to identify varicella-zoster virus DNA by PCR.

Real-time PCR assays have proven to be a tool for the detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus to shorten detection time and improve sensitivity.

Principle of the test

Vitassay qPCR Viral Meningitis test is based on the real-time amplification of a conserved region of the *US4* gene for herpes simplex virus type 1, *US6* gene for herpes simplex virus type 2 and *ORF29* gene for varicella zoster virus. After DNA isolation, the presence of herpes simplex virus 1, herpes simplex virus 2 and/or varicella zoster virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR Viral Meningitis test is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible reaction inhibition. The amplification of the herpes simplex virus type 1 DNA target sequence is detected through the FAM channel, varicella zoster virus DNA target in Cy5 channel, herpes simplex virus type 2 DNA target in ROX channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex II).

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or broken or if the foil has been broken or damaged.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask.
- Do not eat, drink or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

ZP02012 MagPurix Viral/Pathogen Nucleic Acids Extraction Kit B, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).

NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).

NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).

Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).

MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nextractor® NX-48 system, (Genolution).

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized Viral Meningitis Positive Control (red tube) with the 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative and positive controls and add them into each well.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).

- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	1
Denaturation	95°C	10 sec	45
Annealing/Extension (Data collection*)	60°C	50 sec	

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (herpes simplex virus 1), ROX (herpes simplex virus 2), Cy5 (varicella zoster virus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast or the Stratagene Mx3005P™ check that passive reference option ROX is none. (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (herpes simplex virus 1), ROX (herpes simplex virus 2) and Cy5 (varicella zoster virus), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in Cy5, ROX and FAM which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. The assay should be repeated.

The result interpretation is summarized in the following table:

Herpes simplex virus 1 (FAM)	Herpes simplex virus 2 (ROX)	Varicella zoster virus (Cy5)	Internal control	Negative control	Positive control	Interpretation
+	+	+	+/-	-	+	Herpes virus 1, Herpes virus 2 and Varicella zoster virus Positive
-	-	-	+	-	+	Herpes virus 1, Herpes virus 2 and Varicella zoster virus Negative
+	-	-	+/-	-	+	Herpes virus 1 Positive, Herpes virus 2 and Varicella zoster virus Negative
+	+	-	+/-	-	+	Herpes virus 1 and Herpes virus 2 Positive, and Varicella zoster virus Negative.
+	-	+	+/-	-	+	Herpes virus 1 and Varicella zoster virus Positive, and Herpes virus 2 Negative.
-	+	-	+/-	-	+	Herpes virus 2 Positive, Herpes virus 1 and Varicella zoster virus Negative.
-	+	+	+/-	-	+	Herpes virus 2 and Varicella zoster virus Positive, Herpes virus 1 Negative.
-	-	+	+/-	-	+	Varicella zoster virus Positive, Herpes virus 1 and Herpes virus 2 Negative.
+	+	+	+	+	+	Invalid
-	-	-	-	-	-	Invalid

(+) Positive: Amplification signal

(-) Negative: No amplification signal

If the negative samples do not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

In order to confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Besides, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

Vitassay qPCR Viral Meningitis was evaluated using different QCMD panels and INSTAND panels. These panels consist of 91 clinical specimens (samples in transport medium, swabs, urine and plasma). The results were compared with the QCMD and INSTAND final reports. 17 of 91 samples from the panels were positive for herpes simplex virus type 1, 16 of 91 samples were positives for herpes simplex virus type 2 and 25 of 91 samples were positives for varicella zoster virus Vitassay qPCR Viral Meningitis.

The results show a high sensitivity and specificity to detect herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella zoster virus using Vitassay qPCR Viral Meningitis.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of herpes simplex virus type 1, herpes virus simplex type 2 and varicella zoster virus templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 DNA copies per reaction for herpes simplex virus type 2 and varicella zoster virus and a detection limit of ≥ 50 DNA copies per reaction for herpes simplex virus type 1.

Analytical specificity

The analytical specificity for herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella zoster virus was tested within the panel of different microorganisms.

No cross-reactivity of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella zoster virus was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i>	Coxsackievirus type B3
<i>Listeria innocua</i> Serotype 6a/strain CCUG 15531	<i>Streptococcus agalactiae</i> Z019	Parechovirus Type 3
<i>Listeria ivanovii</i> Serovar 5/strain CCUG 15528	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Z022	Parvovirus B19
<i>Listeria monocytogenes</i> Serotype 1/2b	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	St Louis Encephalitis Virus strain 17D
<i>Listeria monocytogenes</i> Serovar 4b/Strain CIP 59.53	<i>Cryptococcus gatti</i> Z156	Tick-Borne encephalitis virus strain Neudorfl
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> MinnA	Chikungunya virus (S27 Petersfield)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	Dengue 1 (Hawaii A strain)
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	<i>Treponema pallidum</i>	Dengue 2 (New Guinea C strain)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> Type II	Dengue 3 (H87)
<i>Enterobacter cloacae</i> Serotype Cloaca A	Enterovirus type 68	Dengue 4 (H241)
<i>Enterobacter aerogenes</i> Serotype Cloaca B	Enterovirus type 71	West Nile Virus (Heja)
<i>Enterococcus durans</i>	Epstein-Barr virus	West Nile Virus (NY99)
<i>Enterococcus faecalis</i>	BK Virus Type Ib2	West Nile Virus (Ug37)
<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	BK Virus Type IV	Yellow Fever Virus (17D strain)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	JC Virus Type 2B	Echovirus Type 30
<i>Candida albicans</i>	JC Virus Type 1A	Echovirus Type 11
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Citomegalovirus strain AD-169	HHV6 strain Z29
<i>Pneumocystis jirovecii</i> Type A1	Coxsackievirus type A24	HHV6 Type A
<i>Pneumocystis jirovecii</i> g885652	Coxsackievirus type A9	HHV6 Type B

Analytical reactivity

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Viral Meningitis for herpes simplex virus type 1 was evaluated against HSV 1 MacIntyre strain and HSV-1 (95/1906) strain showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Viral Meningitis for herpes simplex virus type 2 was evaluated against HSV 2 MS strain, showing positive results.

Analytical reactivity of Vitassay qPCR Viral Meningitis for varicella zoster virus was evaluated against Varicella-Zoster Virus Ellen, Varicella Zoster Virus OKA and Varicella Zoster virus (9/84), showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR Viral Meningitis has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

II: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella zoster virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with samples in transport medium, urogenital swabs, urine, plasma, CFS and epithelial cells of chickenpox lesions or crusts. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens 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 the different pathogens, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

Attached I: Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* See Attached III to configure exposure settings.

Attached II: 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 the following table:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	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	618/660	
Smartcycler® Cepheid	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene	FAM	FAM	Passive reference option 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	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III: Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Bibliography/Bibliografía

1. <https://www.cdc.gov/chickenpox/hcp/clinical-overview.html>
2. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
3. G. Freer et al. Varicella-zoster virus infection: natural history, clinical manifestations, immunity and current and future vaccination strategies. *New microbiológica*. 2018. 41, 2, 95-105.
4. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/varicella-chickenpox>.

Trademarks

CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.

ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.

LightCycler® is a registered trademark of Roche.










Mx3000P™ and Mx3029™ 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.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)

www.vitassay.com