

Vitassay qPCR

MAYV

PCR en tiempo real para la detección cualitativa del virus Mayaro en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the qualitative detection of Mayaro virus in clinical samples.



Uso previsto

Vitassay qPCR MAYV permite la detección cualitativa del virus Mayaro mediante RT-PCR en tiempo real en muestras clínicas. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones producidas por el virus Mayaro.

Referencias

Vitassay qPCR MAYV 4 x 8-well strip, low profile 7041053

Vitassay qPCR MAYV 4 x 8-well strip, high profile 7042053

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S053/ 7042S053	MAYV strips high/low profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C053	MAYV 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 RNA
- Equipo de PCR en 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

El virus Mayaro (MAYV) es un virus de ARN monocatenario con envoltura que pertenece al género *Alphavirus*, la familia *Togaviridae*, y fue descubierto incidentalmente en muestras de sangre de trabajadores rurales en Trinidad y Tobago en 1954. La presencia de MAYV se ha informado principalmente en América Latina, con Brasil con el mayor número de casos notificados de fiebre de Mayaro. También es probable que MAYV circule en el Caribe.

El genoma de MAYV es ARN monocatenario con polaridad positiva y una longitud de aproximadamente 11,5 kilobases (kb). Su estructura genómica forma dos marcos de lectura abiertos, uno que codifica proteínas estructurales y otro que codifica proteínas no estructurales. Estos últimos se expresan como una poliproteína que se escinde durante y después de la traducción en cuatro proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), mientras que los genes estructurales generan las seis proteínas estructurales (C, E1, E2, E3, 6K y transframe). Las partículas virales son icosaédricas y comprenden una nucleocápside cerrada en una envoltura compacta. Los estudios filogenéticos han clasificado las cepas de MAYV en tres genotipos principales, genotipo D (que causa la mayoría de los casos, muy disperso en América del Sur), L (limitado en Brasil) y N (recientemente descrito en Perú).

Las infecciones humanas por MAYV provocan una enfermedad febril aguda que es difícil de diferenciar del dengue o chikungunya. La fase aguda se caracteriza por una viremia breve y transitoria (3 a 4 días), seguida de un período de incubación de 7 a 12 días, en el que los síntomas sistémicos se hacen evidentes. En la mayoría de los casos, la enfermedad de MAYV es inespecífica, leve y autolimitada. Los síntomas principales incluyen escalofríos, fiebre, manifestaciones gastrointestinales, dolor ocular, mialgia y artralgia. Los síntomas agudos generalmente duran de tres a cinco días en la mayoría de los pacientes con enfermedad de Mayaro. La artralgia puede durar meses o años. La artralgia y la mialgia representan 50 a 89% y 75% de los pacientes infectados, respectivamente. Pueden ocurrir complicaciones graves debido a la infección por MAYV, entre las que se encuentran la poliartritis crónica, miocarditis, manifestaciones hemorrágicas y neurológicas e incluso la muerte.

El virus Mayaro se transmite principalmente por los mosquitos de la especie *Haemagogus* que habitan en los árboles, pero MAYV se ha aislado de otros géneros de mosquitos, incluidos *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora* y *Sabethes*. La transmisión de MAYV se produce cuando los mosquitos hembra, principalmente *Haemagogus janthinomys*, adquieren sangre de un huésped infectado con altas concentraciones de MAYV en su sangre. Al igual que otros alfavirus, MAYV puede infectar, replicarse y diseminarse tanto en hospedadores vertebrados como invertebrados. Después de una picadura de un vector infectado, MAYV se propaga a través de los vasos sanguíneos al cuerpo del huésped susceptible. El virus se replica en los glóbulos blancos y se

disemina a los huesos, músculos y articulaciones a través de los principales sitios de replicación (bazo).

El diagnóstico preciso de la infección por MAYV en las comunidades humanas se ve dificultado por la existencia de coinfecciones y por la alta prevalencia de casos asintomáticos. El diagnóstico a menudo se confirma mediante pruebas serológicas, pero el uso de métodos serológicos puede verse afectado por la reactividad cruzada y el período de ventana. El virus es detectable mediante cultivo o PCR de transcripción inversa (RT-PCR) dentro de los primeros 3-5 días de la enfermedad.

Principio del test

Vitassay qPCR MAYV se basa en la amplificación a tiempo real de un fragmento de una región conservada de la zona del gen *nsp1* del virus Mayaro. El RNA viral extraído se transcribe a cDNA utilizando un *primer* específico mediante un paso de transcripción inversa seguido de la reacción en cadena de la polimerasa. La presencia de virus Mayaro se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR MAYV se trata de un ensayo listo para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR en 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 FAM 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 RNA

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.

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado de MAYV Positive Control (tubo rojo) con 100 μ L de agua ultrapura (PCR grade water, 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.

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 μ L de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.

- Pipetear 5 µL de RNA 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
Retrotranscripción	45°C	15 min	1
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 Mayaro) y los canales HEX, JOE o VIC (Control Interno). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast, Applied Biosystems StepOne™, 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 en 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 el canal FAM.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de 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 Mayaro	Control Interno	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+/-	-	+	Virus Mayaro Positivo
-	+	-	+	Virus Mayaro Negativo
+	+	+	+	Inválido
-	-	-	-	Inválido

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas 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 analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del RNA molde de virus Mayaro (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de RNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de virus Mayaro fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Virus Mayaro		
Virus Chikungunya cepa S27 Petersfield	Virus de la fiebre amarilla cepa 17D	Virus de la encefalitis de San Luis cepa 17D
Virus Dengue 2 cepa Nueva Guinea C	Virus Zika cepa MR 766	Virus Dengue 1 cepa Hawaii
Virus West Nile cepa H160/99	Virus Dengue 3 cepa H87	Virus Dengue 4 cepa H241
Virus West Nile Heja	Virus West Nile Ug37	

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR MAYV fue confirmada por medio de la amplificación a tiempo real utilizando virus Mayaro como molde, mostrando un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR MAYV ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ 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 virus Mayaro. Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- 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 del RNA 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 Mayaro, 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.

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 MAYV allows the qualitative detection of Mayaro virus by real-time RT-PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of Mayaro virus infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR MAYV 4 x 8-well strip, low profile	7041053
Vitassay qPCR MAYV 4 x 8-well strip, high profile	7042053

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S053/ 7042S053	MAYV strips high/low profile	-	4x8-well strip
7C053	MAYV 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	Yellow	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

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

Summary

Mayaro virus (MAYV) is an enveloped single-stranded RNA virus which belongs to the genus *Alphavirus*, the family *Togaviridae*, and was discovered incidentally in blood samples of rural workers in Trinidad and Tobago in 1954. The presence of MAYV has been mainly reported in Latin America, with Brazil having the highest number of reported cases of Mayaro fever. MAYV is also likely to circulate in the Caribbean.

The genome of MAYV is a single-stranded RNA with positive polarity and a length of approximately 11.5 kilobases (kb). Its genomic structure forms two open reading frames, one coding for structural proteins and the other coding for non-structural proteins. The latter are expressed as a polyprotein that is cleaved both during and after translation into four non-structural proteins (nsP1, nsP2, nsP3, and nsP4), whereas the structural genes generate the six structural proteins (C, E1, E2, E3, 6K, and transframe). The viral particles are icosahedral, comprising a closed nucleocapsid in a compact envelope. Phylogenetic studies have classified MAYV strains into three major genotypes, genotype D (causing most cases, widely dispersed in South Americans), L (limited in Brazil) and N (newly described in Peru).

Human infections with MAYV result in an acute febrile illness that is difficult to differentiate from dengue or chikungunya. The acute phase is characterized by a short, transient viremia (3–4 days), followed by an incubation period of 7–12 days, in which the systemic symptoms become evident. In most cases, MAYV disease is nonspecific, mild, and self-limited. The main symptoms include chills, fever, gastrointestinal manifestations, eye pain, myalgia, and arthralgia. Acute symptoms generally last three to five days in most patients with Mayaro disease. Arthralgia can last for months to years. Arthralgia and myalgia account for 50–89% and 75% of infected patients, respectively. Severe complications can occur due to MAYV infection, among which are chronic polyarthritis, myocarditis, hemorrhagic and neurological manifestations and even death.

Mayaro virus is primarily transmitted by tree dwelling *Haemagogus* species mosquitoes but MAYV has been isolated from other genera of mosquitoes, including *Culex*, *Mansonia*, *Aedes*, *Psorophora*, and *Sabethes*. MAYV transmission occurs when female mosquitoes mainly *Haemagogus janthinomys*, acquire blood from an infected host with high concentrations of MAYV in its blood. Like other alphaviruses, MAYV can infect, replicate, and disseminate in both vertebrate and invertebrate hosts. After a bite from an infected vector, MAYV spreads via the blood vessels into the body of the susceptible host. The virus replicates in white blood cells and spreads to bones, muscles, and joints via the main sites of replication (spleen).

Accurate diagnosis of MAYV infection in human communities is rendered difficult by the existence of coinfections and due to the high prevalence of asymptomatic cases. The diagnosis is often confirmed by serological testing, but the use of serological methods

can be affected by cross-reactivity and the window period. Virus is detectable by culture or reverse-transcription PCR (RT-PCR) within the first 3-5 days of illness.

Principle of the test

Vitassay qPCR MAYV is based on the real-time amplification of specific conserved fragment of the *nsp1* gene encoded by the Mayaro virus genome. The viral RNA extracted is transcribed into cDNA using a specific primer by reverse transcription step followed immediately in the same well by polymerase chain reaction. The presence of Mayaro virus is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity that uses two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to extend the primers, the probe is hydrolyzed by its 5'-3' exonuclease activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The resulting increase in fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by a real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR MAYV is a ready-to used 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 target sequence is detected through the FAM channel whereas the internal control (IC) in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used).

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 and they must be managed according to the national sanitary waste legislation. 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 RNA extraction

For pretreatment and nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. Follow the manufacturer's instructions for use.

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized MAYV 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 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 RNA sample, negative (yellow tube) and positive (red tube) controls and add them to the corresponding wells.
- 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
Reverse transcription	45°C	15 min	1
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 (Mayaro virus) and HEX, JOE or VIC channels (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ 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 Mayaro virus (FAM), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal for Mayaro virus (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:

Mayaro Virus	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+/-	-	+	Mayaro Virus Positive
-	+	-	+	Mayaro Virus 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 must 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

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of Mayaro virus template ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral RNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for Mayaro virus was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Virus Mayaro		
Chikungunya Virus strain S27 Petersfield	Yellow fever virus strain 17D	St Louis Encephalitis virus strain 17D
Dengue 2 Virus strain New Guinea C	Zika Virus strain MR 766	Dengue 1 Virus strain Hawaii
West Nile Virus strain H160/99	Dengue 3 Virus strain H87	Dengue 4 Virus strain H241
West Nile Virus Heja	West Nile Virus Ug37	

Analytical reactivity

The reactivity of Vitassay qPCR MAYV was confirmed by the real-time amplification using Mayaro virus as template, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR MAYV has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- StepOne™ 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: 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 to place a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of Mayaro virus infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper RNA 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 Mayaro virus, either samples containing high concentrations of target RNA 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 Cycler
	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 must 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. Sun J, Wu D. Mayaro virus, a regional or global threat? *Travel Med Infect Dis.* 2019 Jul 25:101462.
2. Diagne CT, Bengue M, Choumet V, Hamel R, Pompon J, Missé D. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. *Pathogens.* 2020 Sep 8;9(9):738.
3. Waggoner JJ, Rojas A, Mohamed-Hadley A, de Guillén YA, Pinsky BA. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. *J Clin Virol.* 2018 Jan; 98:1-4.
4. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Rodríguez Y, Pacheco Y, Anaya JM, Ramírez-Santana C. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect.* 2018 Sep 26;7(1):163.

Trademarks

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™ and Mx3005™ 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 <i>in vitro</i> 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