

## Protocolo de RT-PCR en tiempo real – Dúplex virus Mayaro (MAYV) y Oropouche (OROV)

- Protocolo dúplex de detección de:
  - Virus Mayaro
  - Segmento S del virus Oropouche y otros virus relacionados (“OROV-like viruses”)
- Referencia: Naveca et al., *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 112(7): 510-513, July 2017

### 1. Mezcla

Componente	Volumen por reacción	
	SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit <sup>1</sup>	AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents <sup>2</sup>
agua (libre de ARNasa/ADNasa) <sup>3</sup>	1.8 µl	1.4 µl
tampón de reacción (2x) <sup>3</sup>	10.0 µl	10.0 µl
cebador MAYV_FNF (10 µM)	0.6 µl	0.6 µl
cebador MAYV_FNR (10 µM)	0.6 µl	0.6 µl
sonda MAYV_FNP (10 µM)	0.2 µl	0.2 µl
cebador OROV_FNF (10 µM)	0.6 µl	0.6 µl
cebador OROV_FNR (10 µM)	0.6 µl	0.6 µl
sonda OROV_FNP (10 µM)	0.2 µl	0.2 µl
enzimas <sup>3</sup>	0.4 µl	0.8 µl
<b>Total por reacción</b>	<b>15 µl</b>	

### 2. ARN

Añadir **5 µl** de ARN o control a los 15 µl de mezcla (volumen total de reacción: 20 µl).  
Incluir **controles** positivos y negativos para evaluar la validez de la corrida.

### 3. Ciclaje<sup>4</sup>

SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit	AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents
1 ciclo de:	1 ciclo de:
50°C por 15 min (transcripción inversa)	50°C por 15 min (transcripción inversa)
95°C por 2 min (activación de la ADN polimerasa)	95°C por 10 min (activación de la ADN polimerasa)
45 ciclos de PCR de:	45 ciclos de PCR de:
95°C por 15 segundos	95°C por 15 segundos
60°C por 30 segundos ( <b>lectura de la fluorescencia en esta etapa</b> )	60°C por 30 segundos ( <b>lectura de la fluorescencia en esta etapa</b> )

Para la lectura de la fluorescencia:

- MAYV: seleccionar fluoróforo VIC.
- OROV: seleccionar fluoróforo FAM.

### 4. Interpretación

**Positividad:** valor de Cq (Ct) ≤ 38

**Validez** de la prueba: los controles positivos y negativos deben tener el resultado esperado.

<sup>1</sup> Invitrogen, número de catálogo: 11732-020 o 11732-088.

<sup>2</sup> Applied Biosystems, número de catálogo: 4387391 o 4387424.

<sup>3</sup> Los volúmenes indicados son para uso de estuches SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit o AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, y deben ajustarse cuando se utilizan otras enzimas.

<sup>4</sup> Los tiempos de transcripción inversa y activación de la ADN polimerasa indicados son para uso de estuches SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit o AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents, y deben ajustarse cuando se utilizan otras enzimas.

**Descargo de responsabilidad:** La mención de empresas específicas o de productos de ciertos fabricantes no implica que la Organización Panamericana de la Salud los apruebe o recomiende con preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan.

5. Cebadores y sondas

MAYV_FNF	5'-CACGGACMTTTTGCCTTCA
MAYV_FNR	5'-AGACTGCCACCTCTGCTKGAG
MAYV_FNP	5'-VIC-ACAGATCAGACATGCAGG-NFQ-MGB
OROV_FNF	5'-TCCGGAGGCAGCATATGTG
OROV_FNR	5'-ACAACACCAGCATTGAGCACTT
OROV_FNP	5'-FAM-CATTTGAAGCTAGATACGG-NFQ-MGB