

Real Time PCR Detection Reagents RUO

Oropouche Virus

Instructions for use

RUO

For Research Use Only (RUO)

This product has no declared clinical intended purpose and is not for clinical diagnostic use. No claim or representation is intended to provide information for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Solo para uso en investigación

Este producto no tiene un propósito clínico declarado y no es para uso en diagnóstico clínico. No existe la pretensión o representación de proporcionar información para el diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad.

These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 1 x 8-well strips, low profile	VS-ORO101LRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 1 x 8-well strips, high profile	VS-ORO101HRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, low profile	VS-ORO106LRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, high profile	VS-ORO106HRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, low profile	VS-ORO112LRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, high profile	VS-ORO112HRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, low profile	VS-ORO113LRUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, high profile	VS-ORO113HRUO

Table A 1. References for Open format with internal control products. / Referencias para productos Open Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 4 tubes x 24 reactions	VS-ORO196TRUO

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

OPEN FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 3) / OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 1 x 8-well strips, low profile	VS-ORO101LERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 1 x 8-well strips, high profile	VS-ORO101HERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, low profile	VS-ORO106LERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 6 x 8-well strips, high profile	VS-ORO106HERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, low profile	VS-ORO112LERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 12 x 8-well strips, high profile	VS-ORO112HERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, low profile	VS-ORO113LERUO
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 96-well plate, high profile	VS-ORO113HERUO

Table A 3. References for Open format with extraction control products. / *Referencias para productos Open Format con control de extracción.*

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 4) / FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>Oropouche Virus</i> Real Time PCR Detection Reagents RUO, 4 tubes x 24 reactions	VS-ORO196TERUO

Table A 4. References for Tube format with extraction control products. / *Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.*

Content

1. Use.....	7
2. Principle of the procedure.....	7
3. Reagents provided	7
4. Reagents and equipment to be supplied by the user	7
5. Transport, storage and use conditions.....	8
6. Additional Information	8
7. Test procedure	9
7.1. Specimen collection, transport and storage	10
7.2. RNA extraction.....	10
8. Result interpretation	10
8.1. References with internal control (references in Annexes 1 and 2)	10
8.2. References with extraction control (references in Annexes 3 and 4)	12
9. Limitations of the test.....	13
10. Quality control.....	14
ANNEX 1.....	15
A1.1 Principle of the procedure	15
A1.2 Reagents provided.....	15
A1.3 Test procedure.....	16
A1.3.1 Lyophilized positive control.....	16
A1.3.2 PCR protocol.....	16
ANNEX 2.....	18
A2.1 Principle of the procedure	18
A2.2 Reagents provided.....	18
A2.3 Test procedure.....	18
A2.3.1 Lyophilized positive control.....	18
A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube	19
A2.3.3 PCR protocol	19
ANNEX 3.....	21
A3.1 Principle of the procedure	21

A3.2 Reagents provided	21
A3.3 Test procedure	22
A3.3.1 Lyophilized extraction control	22
A3.3.2 Lyophilized positive control	23
A3.3.3 PCR protocol	23
ANNEX 4.....	25
A4.1 Principle of the procedure	25
A4.2 Reagents provided	25
A4.3 Test procedure.....	26
A4.3.1 Lyophilized extraction control	26
A4.3.2 Lyophilized positive control.....	26
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube	26
A4.3.4 PCR protocol	27

Contenido

1. Uso.....	28
2. Procedimiento	28
3. Reactivos suministrados	28
4. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario.....	29
5. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso.....	29
6. Información Adicional	29
7. Procedimiento del test	31
7.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.....	31
7.2. Extracción de RNA.....	31
8. Interpretación de resultados.....	31
8.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	31
8.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	33
9. Limitaciones del test	34
10. Control de calidad.....	35
ANEXO 1.....	36

A1.1 Procedimiento	36
A1.2 Reactivos suministrados.....	36
A1.3 Procedimiento del test.....	37
A1.3.1 Control positivo liofilizado	37
A1.3.2 Protocolo PCR	37
ANEXO 2.....	39
A2.1 Procedimiento	39
A2.2 Reactivos suministrados.....	39
A2.3 Procedimiento del test.....	39
A2.3.1 Control positivo liofilizado	39
A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada	40
A2.3.3 Protocolo PCR	40
ANEXO 3.....	42
A3.1 Procedimiento	42
A3.2 Reactivos suministrados.....	42
A3.3 Procedimiento del test.....	44
A3.3.1 Control de extracción liofilizado	44
A3.3.2 Control positivo liofilizado	44
A3.3.3 Protocolo PCR	44
ANEXO 4.....	46
A4.1 Procedimiento	46
A4.2 Reactivos suministrados.....	46
A4.3 Procedimiento del test.....	47
A4.3.1 Control de extracción liofilizado	47
A4.3.2 Control positivo liofilizado	47
A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada	47
A4.3.4 Protocolo PCR	48
Symbols for components and reagents/Símbolos para reactivos y productos	49
Trademarks	49

ENGLISH

1. Use

For Research Use Only (RUO). Not for use in diagnostic procedures.

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO is a non-automatized RT-qPCR test designed for the specific qualitative detection of RNA from Oropouche virus in human samples.

This test must be used for research purposes and has no medical objective.

2. Principle of the procedure

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO is a RT-qPCR test designed for the specific qualitative detection of RNA from Oropouche virus in human samples. The isolated RNA target is transcribed generating complementary DNA by reverse transcriptase which is followed by the amplification of a conserved region of the *N* gene (nucleocapsid protein-coding gene) of Oropouche virus, using specific primers and fluorescent-labelled probes.

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contains all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an **internal** or **extraction control** to verify the correct functioning of the amplification mix.

The **internal control (IC)** verifies if the amplification reaction works properly. If the PCR reaction is inhibited due to the presence of an artifact/inhibitor or because the well is incorrectly rehydrated, this control may become negative.

The **extraction control (EC)** monitors the efficiency of the extraction method and verifies the PCR reaction. It is supplied in an additional vial and must be added to the samples before the extraction process.

3. Reagents provided

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open format products with internal control, Annex 2 for tube format products with internal control, Annex 3 for open format products with extraction control, and Annex 4 for tube format products with extraction control.

4. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- RNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e., individual tubes, well-strips and/or microplates).
Only for Tubes format (Annexes 2 and 4).

Optional:

- Control material for reverse transcription step (such as reference RNA or viral RNA particles).

5. Transport, storage and use conditions

- The RUO kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the kit label.
- Once the tube or master mix plate/strip is opened/or rehydrated, it must be stored to keep the vial, plate or strip away from light.
- Keep components away from light.

6. Additional Information

- This VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO is for Research Use Only. It is not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Once the protective aluminium seal has been removed from the plates or strips or the tubes have been opened, the end user must use the plates, strips, or tube in the shortest time possible to protect the master mix from sunlight.
- Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant.

- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-ORO113LRUO, VS-ORO113HRUO, VS-ORO113LERUO and VS-ORO113HERUO). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- To avoid label deterioration, do not use the product near solvents.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or colour different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- It is not recommended to leave the vials, plate or strips open without resuspending, as this may cause deterioration of the reagent. Likewise, once they are rehydrated, the addition of nucleic acid into the reaction-mix and the performance of the RT-qPCR must be carried out immediately.
- 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. Use separate areas for the preparation of samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO and any additional reagents or equipment required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles, and mask. Do not eat, drink smoke, or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions, and procedures.

7. Test procedure

Please see Annex 1 for open format products with internal control Test Procedure, Annex 2 for Tube format products with internal control Test Procedure, Annex 3 for open format products with extraction control Test Procedure, and Annex 4 for Tube format products with extraction control Test Procedure.

7.1. Specimen collection, transport and storage

Collection, storage, and transport of samples should be maintained per the conditions validated by the user and according to appropriate laboratory guidelines.

7.2. RNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

Due to VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO is also available with Extraction Control (references included in Annexes 3 and 4), if the Extraction Control (EC) is used to monitor nucleic acid isolation and as PCR inhibition control, add 5 µL of the reconstituted EC to the specimen and/or lysis buffer mixture. Close each tube and vortex for 10 seconds. If the Extraction Control is used only as a PCR inhibition control, 1µL of the reconstituted EC should be added per well/reaction.

For RNA extraction from samples, you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available RNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions.

8. Result interpretation

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

8.1. References with internal control (references in Annexes 1 and 2)

The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions. Check Internal Control (IC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding to the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for Oropouche virus in the positive control well.

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

Controls	Oropouche virus (FAM) ¹	Internal Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for the target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2 The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC).

Assessment of research samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the results cannot be interpreted.

For interpretation of sample results, **select in the thermocycler only the channels where targets are detected.** Then, use the following table, read, and analyze the results:

Oropouche virus (FAM)	Internal Control (HEX)	Interpretation for samples	
≤40	≤40 ¹	Valid	Oropouche virus RNA Detected
>40 or no signal	≤35 ²	Valid	Target not Detected ²
>40 or no signal	>35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

Table 2. Interpretation of sample results. Ct values no signal = no amplification curves.

1 The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40). Sometimes, its detection does not occur because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. In this case, the reaction should be considered as 'Invalid' and it is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the RNA sample 1:10.

2 In the case of Oropouche target gene negative, IC must show an amplification signal with Ct ≤ 35. If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the correct performance of each workflow steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

8.2. References with extraction control (references in Annexes 3 and 4)

The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions. Check Extraction Control (EC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix.

It is recommended to set the threshold values for each channel (target) independently by the end-user. The threshold must be established in each run. Please, if your equipment sets the threshold automatically, check and verify that it adjusts to the positive control or adjust it manually. For each channel, select the well corresponding to the positive control, and fix the threshold within the exponential phase of the fluorescence curve and above any background signal (below the baseline). Once the threshold has been established, the rest of the samples of the same run can be interpreted.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for Oropouche virus in the positive control well.

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

Controls	Oropouche virus (FAM) ¹	Extraction Control (HEX) ²	Interpretation of Controls
Positive Control (PC)	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	>40 or no signal	≤40	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curves.

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for the target channel), all results are reported as 'Invalid' and retesting is required.

2 The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in control wells (PC and NC). 1 µL of EC must be added to PC and NC prior to start RT-qPCR (see section "PCR protocol" of Annexes 3 and 4).

Assessment of research samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the results cannot be interpreted.

For interpretation of sample results, **select in the thermocycler only the channels where targets are detected.** Then, use the following table, read, and analyze the results:

Oropouche virus (FAM)	Extraction Control (HEX)	Interpretation for samples	
≤ 40	$\leq 40^1$	Valid	Oropouche virus RNA Detected
> 40 or no signal	$\leq 35^2$	Valid	Target not Detected ²
> 40 or no signal	> 35 or no signal ²	Invalid	Test Failure – Repeat Testing ²

Table 4. Interpretation of sample results. Ct values no signal = no amplification curves.

1 The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤ 40). Sometimes, its detection does not occur because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids. In this case, the reaction should be considered as 'Invalid' and it is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the RNA sample 1:10. Differences can be observed in the values of Ct in the extraction control between the controls and samples, due to the extraction process.

2 In the case of Oropouche target gene negative, EC must show an amplification signal with Ct ≤ 35 . If there is an absence of signal or Ct value > 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the RT-qPCR diluting the RNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use; the correct performance of each workflow steps and review the parameters; and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence. It is also recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. Depending on the available material:

- repeat RT-qPCR with the same isolated RNA sample, or
- re-extract and retest another aliquot of the same specimen or,
- obtain a new specimen and retest.

9. Limitations of the test

- The test must be used for research use only. Not for use in diagnostic procedures.
- The quality of the test depends on the quality of the sample: nucleic acid must be properly extracted from samples.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by Oropouche virus, either by *Oropouche Virus* Positive Control, by samples containing high concentrations of target RNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *Oropouche Virus* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in separate laboratory areas.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:

-
- Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including RNA extraction).
 - Degradation of the RNA during sample shipping/storage and/or processing.
 - Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown Oropouche virus variants.
 - A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
 - The presence of RT-qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics, or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
 - Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment (even being the same model), extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.

10. Quality control

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) or the Extraction Control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

ANNEX 1

OPEN FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Oropouche virus	FAM	<i>N</i>
Internal control (IC)	HEX*	-

Table A1 1. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.certest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.2 and A1.3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.2 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible instruments. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible instruments.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Oropouche Virus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers, probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal Control in stabilized format	White (Opaque)	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non-template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	1/6/12 x 8-cap strip

Table A1 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-ORO101LRUO, VS-ORO101HRUO, VS-ORO106LRUO, VS-ORO106HRUO, VS-ORO112LRUO and VS-ORO112HRUO.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Oropouche Virus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers, probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal Control in stabilized format	White (Opaque)	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non-template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-ORO113LRUO and VS-ORO113HRUO.

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

Oropouche Virus Positive Control contains high copies of the template; the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) by adding 400 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.2 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 for each assay.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from strips you need, or plate, for the assay.

- 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 *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or strips in the thermocycler.

3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed 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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A1 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Oropouche virus*) and HEX (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Oropouche virus	FAM	<i>N</i>
Internal control (IC)	HEX*	-

Table A2. 1. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the following materials and reagents detailed in Table A2.2.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Oropouche Virus</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers, probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal Control in stabilized format	White (Opaque)	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Negative control	Non-template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-ORO196TRUO.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

Oropouche Virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized

Oropouche Virus Positive Control (red vial) by adding 400 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Oropouche Virus* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tubes have been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions.

A2.3.3 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 for each assay.

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Oropouche Virus* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of RNA sample, reconstituted *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps. Centrifuge briefly.

Load the tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed 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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A2. 3. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Oropouche virus) and HEX (Internal Control (IC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

ANNEX 3

OPEN FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Oropouche virus	FAM	<i>N</i>
Extraction control (EC)	HEX*	-

Table A3 1. Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.certest.es.

A3.2 Reagents provided

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the following materials and reagents detailed in Tables A3.2 and A3.3. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A3.2 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible instruments. Table A3.3 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible instruments.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Oropouche Virus</i> 8-well strips	A mix of enzymes, primers, probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White (Opaque)	1/6/12 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non-template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	1/6/12 x 8-cap strip

Table A3 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-ORO101LERUO, VS-ORO101HERUO, VS-ORO106LERUO, VS-ORO106HERUO, VS-ORO112LERUO and VS-ORO112HERUO.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Oropouche Virus</i> 96-well plate	A mix of enzymes, primers, probes, buffer, dNTPs, and stabilizers in stabilized format	White (Opaque)	1 plate
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non-template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing plate during thermal cycling	Transparent	12 x 8-cap strip

Table A3 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-ORO113LERUO and VS-ORO113HERUO.

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in a pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) by adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in the pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstituting the lyophilized *Oropouche Virus* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

Oropouche Virus Positive Control contains high copies of the template; the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) by adding 400 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A3.3.3 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 for each assay.

Please note: In case the number of reactions required/needed is less than supplied on one strip or plate, before removing the protective seal, carefully cut out the required wells and store the rest inside the bag with the desiccant. Peel off protective aluminium seal from strips you need, or plate, for the assay.

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 Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of RNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

Add 1 µL of Extraction Control (EC, green vial) into the Positive Control and Negative Control wells.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to each sample well.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or 96-well plate.

Load the plate or strips in the thermocycler.

3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed 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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A3 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (Oropouche virus) and HEX (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer, polymerase and retrotranscriptase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Oropouche virus	FAM	<i>N</i>
Extraction control (EC)	HEX*	-

Table A4. 1.Target, channel and genes.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A4.2 Reagents provided

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO includes the following materials and reagents detailed in Table A4.2.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
<i>Oropouche Virus</i> Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers, probes, buffer, dNTPs, and stabilizers in stabilized format	White (Opaque)	4 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized cDNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non-template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A4. 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO with Ref. VS-ORO196TERUO.

A4.3 Test procedure

A4.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in a pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) by adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in the pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstituting the lyophilized *Oropouche Virus* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

Oropouche Virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) by adding 400 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *Oropouche Virus* Reaction-Mix tube in a pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tubes have been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions.

A4.3.4 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 for each assay.

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *Oropouche Virus* Reaction-Mix (white vial) into each tube.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of RNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *Oropouche Virus* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

Add 1 µL of Extraction Control (EC, green vial) into the Positive Control and Negative Control wells.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to each sample well.

Close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate or strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler.

Program the thermocycler following the conditions listed 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 sec	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 sec	60°C

Table A4. 3. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (*Oropouche virus*) and HEX (Extraction Control (EC)). Depending on the equipment used select the proper detection channel.

ESPAÑOL

1. Uso

Sólo para uso en investigación (RUO). No para uso en procedimientos de diagnóstico.

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO es un test de RT-qPCR no automatizado diseñado para la detección cualitativa específica de RNA del virus Oropouche en muestras humanas.

Este test debe ser utilizado para fines de investigación y no tiene ningún objetivo médico.

2. Procedimiento

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO es una prueba de RT-qPCR diseñada para la detección cualitativa y específica de RNA del virus Oropouche en muestras humanas. El RNA diana extraído es transcrito generando DNA complementario mediante la transcriptasa reversa y a continuación se produce la amplificación de una región conservada del gen *N* (gen codificante de la proteína nucleocápside) del virus Oropouche, usando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia.

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa y retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como un **control interno** o **de extracción** con el que verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

El **control interno (CI)** verifica si la reacción de amplificación funciona correctamente. Si la reacción PCR se inhibe por la presencia de un artefacto/inhibidor o porque el pocillo está incorrectamente rehidratado, este control puede resultar negativo.

El **control de extracción (CE)** controla la eficiencia del método de extracción y verifica la reacción PCR. Se suministra en un vial adicional y debe añadirse a las muestras antes del proceso de extracción.

3. Reactivos suministrados

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para “open format” con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para “open format” con productos con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

4. Reactivos y equipos a suministrar por el usuario

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de RNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: - 30°C a - 10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).

Opcional:

- Material de control para la etapa de la transcripción reversa (como RNA de referencia o partículas virales de RNA).

5. Condiciones de transporte, almacenamiento y uso

- El transporte y almacenaje de los kits RUO puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- Una vez abierto o rehidratado el tubo o la placa/tira de master mix, debe guardarse para mantener el vial, placa o tira alejados de la luz.
- Proteger los componentes de la luz.

6. Información Adicional

- VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Reagents RUO es solo para uso en investigación. No es para uso en procesos de diagnóstico o terapéuticos.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.

- No utilizar los reactivos si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los reactivos una vez abiertos.
- Una vez retirado el aluminio protector de las placas o tiras o abiertos los tubos, el usuario final deberá utilizar las placas, tiras o el tubo en el menor tiempo posible para proteger la mezcla de reacción de la luz solar.
- A tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior a la suministrada en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, corte con cuidado los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los reactivos con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para las referencias VS-ORO113LRUO, VS-ORO113HRUO, VS-ORO113LERUO y VS-ORO113HERUO). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- Para evitar el deterioro de la etiqueta, no usar el producto cerca de disolventes.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- No se recomienda dejar los viales, placa o tiras abiertas sin resuspender, ya que esto puede causar un deterioro del reactivo. Asimismo, una vez rehidratados, se debe añadir el ácido nucleico en la mezcla de reacción y llevarse a cabo el ensayo qPCR inmediatamente.
- 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. Use áreas separadas para la preparación de muestras y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.

- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

7. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para “open format” con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para “open format” con productos con control de extracción y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

7.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

La recolección, el almacenamiento y el transporte de muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario y de acuerdo con las guías de laboratorio correspondientes.

7.2. 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.

Debido a que VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO está también disponible con control de extracción (las referencias se incluyen en los Anexos 3 y 4), si el control de extracción (CE) se usa para monitorear el aislamiento de los ácidos nucleicos y como control de inhibición de la PCR, agregue 5µl del CE reconstituido a la muestra y/o mezcla de tampón de lisis. Cierre cada tubo y agite en el vórtex durante 10 segundos. Si el control de extracción se usa solo como control de inhibición de la PCR, se debe agregar 1µl del CE reconstituido por pocillo/reacción.

Para la extracción de RNA a partir de las muestras 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. Interpretación de resultados

Sólo para uso en investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico.

8.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante. Compruebe la señal de Control Interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para el virus Oropouche en el pocillo de control positivo.

Para una prueba válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Virus Oropouche (FAM) ¹	Control Interno (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	>40 o sin señal	≤40	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para el canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

La valoración de los resultados de las muestras de investigación debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra, **seleccione en el termociclador solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

Virus Oropouche (FAM)	Control Interno (HEX)	Interpretación de muestras	
≤40	≤40 ¹	Válido	RNA de virus Oropouche Detectado
>40 o sin señal	≤35 ²	Válido	Diana no detectada ²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido- Repetir test ²

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras. Ct valores sin señal = sin curva de amplificación.

1 El control interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40). En ocasiones, la detección del control interno no ocurre ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción se considera 'Inválida' y se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10.

2 En el caso de que el gen diana del virus Oropouche resulte negativo, el CI debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $Ct > 35$ del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el correcto rendimiento de cada etapa del flujo de trabajo, y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- a) Repetir la RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada, o
- b) Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- c) Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

8.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante. Compruebe la señal de Control de Extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación.

Se recomienda establecer los valores umbral para cada canal (diana) de forma independiente por parte del usuario final. El valor umbral debe establecerse en cada ensayo. Por favor, si su equipo establece el umbral automáticamente, compruebe y verifique que se ajusta al control positivo o ajústelo manualmente. Para cada canal, seleccione el pocillo correspondiente al control positivo y fije el valor umbral dentro de la fase exponencial de la curva de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (por debajo de la línea base). Una vez establecido el umbral, se pueden interpretar el resto de las muestras del mismo ensayo.

El uso del control positivo y del control negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para el virus Oropouche en el pocillo del control positivo.

Para una prueba válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	Virus Oropouche (FAM) ¹	Control de Extracción (HEX) ²	Interpretación de los Controles
Control Positivo (CP)	≤ 40	≤ 40	Válido
Control Negativo (CN)	> 40 o sin señal	≤ 40	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Valores Ct sin señal = sin curva de amplificación.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para el canal diana), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$) en los pocillos del CP y CN. Se debe añadir 1µL de CE al CP y CN antes de comenzar la RT-qPCR (ver sección "Protocolo PCR" de los Anexos 3 y 4).

La valoración de los resultados de las muestras de investigación debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra, **seleccione en el termociclador solo los canales donde se detectan las dianas**. Después, use la siguiente tabla, lea y analice los resultados:

Virus Oropouche (FAM)	Control de Extracción (HEX)	Interpretación de muestras	
≤ 40	≤ 40 ¹	Válido	RNA de virus Oropouche Detectado
>40 o sin señal	≤ 35 ²	Válido	Diana no detectada ²
>40 o sin señal	>35 o sin señal ²	Inválido	Test Fallido- Repetir test ²

Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras. Ct valores sin señal = sin curva de amplificación.

1 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación ($Ct \leq 40$). En ocasiones, la detección del control de extracción no ocurre ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última. En este caso, la reacción se considera 'Inválida' y se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10. Se pueden observar diferencias en los valores de Ct de los controles de extracción entre los controles y las muestras, debido al proceso de extracción.

2 En el caso de que el gen diana del virus Oropouche resulte negativo, el CE debe mostrar una señal de amplificación con $Ct \leq 35$. En el caso de ausencia de señal o valor de $Ct > 35$ del control de extracción, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la RT-qPCR diluyendo la muestra de RNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el correcto rendimiento de cada etapa del flujo de trabajo, y revisar los parámetros; y verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia. También se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. Según el material disponible:

- Repetir la RT-qPCR con la misma muestra de RNA aislada, o
- Volver a extraer y volver a analizar otra alícuota de la misma muestra o,
- Obtener una nueva muestra y volver a realizar la prueba.

9. Limitaciones del test

- Este test debe usarse únicamente para investigación. No para uso en procedimientos de diagnóstico.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras.
- 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 el virus Oropouche, ya sea a causa de *Oropouche Virus* Positive Control, por muestras con una elevada concentración de RNA diana o por contaminación a causa de productos de la PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *Oropouche Virus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el Agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos se debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.
- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de RNA).
 - Degradación del RNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Mutaciones o polimorfismos en regiones de unión de cebadores o sondas que pueden afectar la detección de variantes nuevas o desconocidas del virus Oropouche.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de RT-qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado (incluso siendo el mismo modelo), sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.

10. Control de calidad

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

ANEXO 1

OPEN FORMAT CON CONTROL INTERNO

A1.1 Procedimiento

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa y retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Oropouche	FAM	N
Control Interno (CI)	HEX*	-

Tabla A1. 1. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.2 y A1.3. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.2 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para placas de 96 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Oropouche Virus</i> 8-well strips	Mezcla de enzimas, cebadores, sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-ORO101LRUO, VS-ORO101HRUO, VS-ORO106LRUO, VS-ORO106HRUO, VS-ORO112LRUO y VS-ORO112HRUO.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Oropouche Virus</i> 96-well plate	Mezcla de enzimas, cebadores, sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco (Opaco)	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A1. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-ORO113LRUO y VS-ORO113HRUO.

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Oropouche Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Oropouche Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo.

Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las tiras que necesite para el ensayo.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Oropouche Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar las tiras o la placa en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	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 A1. 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (virus Oropouche) y HEX (Control Interno (CI)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección apropiado.

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

A2.1 Procedimiento

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa y retrotranscriptasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Oropouche	FAM	N
Control Interno (CI)	HEX*	-

Tabla A2. 1. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.2.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Oropouche Virus</i> Reaction-Mix tube	Mezcla de enzimas, cebadores, sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco (Opaco)	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-ORO196TRUO.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *Oropouche Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes.

Reconstituir *Oropouche Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar 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). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular *Oropouche Virus* Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir los tubos de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez los viales de Reaction-Mix han sido resuspendidos, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones.

A2.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo.

- 1) Añadir la mezcla de reacción rehidratada a los pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *Oropouche Virus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de RNA extraído de cada muestra, de *Oropouche Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o de Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones. Centrifugar brevemente.

Colocar los tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	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 A2. 3. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (virus Oropouche) y HEX (Control Interno (CI)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección apropiado.

ANEXO 3

OPEN FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

A3.1 Procedimiento

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa y retrotranscriptasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE), que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Oropouche	FAM	N
Control de Extracción (CE)	HEX*	-

Tabla A3. 1. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.2 y A3.3. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.2 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con instrumentos compatibles para placas de 96 pocillos.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Oropouche Virus</i> 8-well strips	Mezcla de enzimas, cebadores, sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco (Opaco)	1/6/12 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	1/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-ORO101LERUO, VS-ORO101HERUO, VS-ORO106LERUO, VS-ORO106HERUO, VS-ORO112LERUO y VS-ORO112HERUO.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Oropouche Virus</i> 96-well plate	Mezcla de enzimas, cebadores, sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco (Opaco)	1 placa
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar la placa durante el ciclo térmico	Transparente	12 tiras de 8 tapones

Tabla A3. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-ORO113LERUO y VS-ORO113HERUO.

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *Oropouche Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Oropouche Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Oropouche Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A3.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo.

Tener en cuenta: en caso de que el número de reacciones requeridas/necesarias sea inferior al suministrado en una tira o placa, antes de retirar el sello protector, recorte cuidadosamente los pocillos necesarios y guarde el resto dentro de la bolsa con el desecante. Retire el sello protector de aluminio de las tiras que necesite para el ensayo.

1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de RNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Oropouche Virus* Positive Control (vial rojo) reconstituido en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1 µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo donde haya muestra.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar las tiras o la placa en el termociclador.

3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	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 A3. 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (virus Oropouche) y HEX (Control de Extracción (CE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección apropiado.

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

A4.1 Procedimiento

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa y retrotranscriptasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE), que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana	Canal	Gen
Virus Oropouche	FAM	N
Control de Extracción (CE)	HEX*	-

Tabla A4. 1. Diana, canal y genes.

* seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.2.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>Oropouche Virus</i> Reaction-Mix tube	Mezcla de enzimas, cebadores, sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco (Opaco)	4 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>Oropouche Virus</i> Positive Control	cDNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico no infeccioso liofilizado	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Violeta	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Oropouche Virus* Real Time PCR Detection Reagents RUO con Ref. VS-ORO196TERUO.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio y después se debe usar para reconstituir el *Oropouche Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *Oropouche Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *Oropouche Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 400 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar 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). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrir y manipular *Oropouche Virus* Reaction-Mix tube en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir los tubos de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez los viales de Reaction-Mix han sido resuspendidos, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones.

A4.3.4 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo.

- 1) Añadir la mezcla de reacción rehidratada a los pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *Oropouche Virus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de RNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *Oropouche Virus* Positive Control (vial rojo) reconstituido en los pocillos reservados para el control positivo.

Añadir 1 µL de Control de Extracción (CE, vial verde) en los pocillos del Control Positivo y Control Negativo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a cada pocillo donde haya muestra.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 pocillos.

Colocar las tiras o la placa en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador.

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	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 A4. 3. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (virus *Oropouche*) y HEX (Control de Extracción (CE)). Dependiendo del equipo utilizado, seleccione el canal de detección apropiado.

Symbols for components and reagents/Símbolos para reactivos y productos



Keep dry
Almacenar en
lugar seco



Use by
Fecha de
caducidad



Manufacturer
Fabricante



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



Catalogue
number

Número de
referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Change Control / Control de Cambios		
Version No. / Versión nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original Version / Versión Original	09/07/2024

Table A 5. Control change table / Tabla de Control de Cambios.

Revision: 9th July 2024.

VIASURE

by **certest**



Certest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, N°1 50840,
San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)



(+34) 976 520 354



viasure@certest.es



www.certest.es

certest

F-349 rev.01

Modification rights reserved. All rights reserved. © Certest Biotec, S.L.
The products, services and data set out in this document may suffer changes
and/or variations on the texts and pictures shown.